



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH



Escola Politècnica Superior
d'Enginyeria de Manresa

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Escola Politècnica Superior d'Enginyeria de Manresa
Universitat Politècnica de Catalunya

Estudio del uso de Microorganismos Eficientes (EM) para la valorización de residuos orgánicos como suplemento alimenticio animal

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

Autor: Gabriel Gallego Prado

Tutores: Antonio David Dorado
Mariano Chirivella

Curso 2016-2017

Resumen

En la actualidad, los residuos orgánicos urbanos tienen tan sólo tres vías posibles dentro del marco autonómico: vertedero, valorización energética y compostaje/biometanización; además de derivados de ellos. En esta memoria se estudia la alternativa de valorizar una parte de estos residuos orgánicos, los restos de cocina, como suplemento alimenticio animal. Para ello se propone un ensilado con Microorganismos Eficientes (EM) como aditivo. Con tal de sopesar esta alternativa se estudió la ensilabilidad de los residuos de cocina producidos en diversos comedores de la isla de Gran Canaria, su calidad nutritiva y fermentativa durante el ensilado, la presencia de patógenos y la aceptabilidad del producto obtenido por parte de cerdos de engorde y gallinas ponedoras. Además, se determinó el contenido NPK de los lixiviados formados para evaluar su potencial como fertilizante. Los resultados mostraron que los residuos orgánicos de cocina utilizados en este estudio presentan una ensilabilidad media-alta. Referente a la calidad nutritiva, se mantuvo estable en el tiempo, con un moderado contenido en materia seca, aunque el contenido en proteína bruta fue relativamente bajo (7 %MS). La digestibilidad estimada fue de aproximadamente el 72 %. En cuanto al análisis de la calidad fermentativa, se obtuvieron valores de nitrógeno amoniacal y de azúcares solubles bajos al cabo del tiempo, así como ausencia de productos metabólicos secundarios peligrosos (ácido acético, propanoico, butírico) y un contenido alto en ácido láctico, entorno al 6 %. Las pruebas de palatabilidad mostraron un consumo y preferencia de los cerdos y las gallinas por las raciones con ensilado, siendo esta preferencia más acentuada en el segundo caso. Por otra parte, no se detectó la presencia de Salmonela, E.coli, ni coliformes. De este modo, el uso de EM como aditivo no provocó un desajuste en el proceso clásico del ensilado, aunque se deberían realizar estudios posteriores. En último lugar, los lixiviados obtenidos presentaron unos contenidos de 320 mg N/l, 1005 mg P/l y 3610 mg K/l.

Palabras clave: Microorganismos eficientes, residuos orgánicos, fermentación anaerobia, ensilaje, alimentación animal

Resum

En l'actualitat, els residuos orgànics urbans tenen, només, tres possibles vies dins de l'àmbit autonòmic: abocador, valorització energètica i compostatge/biometanització; apart de derivats. En aquesta memòria es vol estudiar l'alternativa de valoritzar una part d'aquests residuos orgànics, les restes de cuina, com a suplement alimentari animal. Per tal d'aconseguir-ho es proposa un ensitjament amb Microorganismes Eficients (EM) com additiu. Amb aquest objectiu es va estudiar la ensilabilitat dels residus de cuina produïts en diversos menjadors de l'illa de Gran Canària, la seva qualitat nutritiva i fermentativa durant l'ensitjament, la presència de patògens i l'acceptabilitat del producte obtingut per part de porcs d'engreix i gallines ponedores. A més, es va determinar el contingut NPK dels llixiviats formats per avaluar el seu potencial com a fertilitzant. Els resultats van mostrar que els residus orgànics de cuina utilitzats en aquest estudi presenten una ensilabilitat mitjana-alta. Pel que fa a la qualitat nutritiva, es va mantenir estable en el temps, amb un moderat contingut en matèria seca, tot i que el contingut en proteïna bruta va ser baix (7%MS). La digestibilitat estimada va ser aproximadament del 72%. L'anàlisi de la qualitat fermentativa va donar com a resultats uns continguts baixos en nitrogen amoniacal i sucres solubles al cap del temps, així com absència de productes metabòlics secundaris perillosos (àcid acètic, propanoic i butíric) i un contingut alt en àcid làctic, entorn al 6%. Les proves de palatabilitat van mostrar un consum i preferència per les racions amb ensitjat tant per part dels porcs com de les gallines. En el cas de les gallines aquesta preferència va ser més notable. D'altra banda no es va detectar presència de salmonel·la, E.coli, ni coliformes. D'aquesta manera, l'ús de EM com additiu no va provocar un desajust en el procés clàssic de l'ensitjament, tot i que s'haurien de realitzar estudis posteriors. En darrer lloc, els llixiviats obtinguts van presentar uns continguts de 320 mg N/l, 1005 mg P/l i 3610 mg K/l.

Paraules clau: Microorganismes eficients, residus orgànics, fermentació anaeròbia, ensilatge, alimentació animal

Abstract

Nowadays, urban organic wastes have only three possible ways to be treated within the autonomic framework: landfill, energetic valorization and composting/biomethanization; as well as some derived of them. In this document, an alternative treatment way for these organic residues (kitchen waste) was studied: valorization as a supplement for animal feed. For this purpose a silage with Effective Microorganisms as an additive was made. In order to determinate if this alternative is viable or not, ensilability of the cooking residues produced in various soup kitchens of the island of Gran Canaria, its nutritive and fermentative quality during the ensilage, the presence of pathogens and the acceptability of the product obtained from pigs and poultry were studied. Also, the leachates produced in the silage were analyzed in order to determine the content in NPK. The results have shown that the organic kitchen residues used in this study had medium-high ensilability. Regarding nutritional quality, it remained stable over time, with a moderately dry matter content and a poor crude protein content (7 % MS). The estimated digestibility was approximately 72%. The analysis of the fermentative quality showed low values of ammoniacal nitrogen and soluble sugars over time, as well as the absence of dangerous secondary metabolic products (acetic acid, propanoic acid and butyric acid) and a high content of lactic acid (6%). The palatability test resulted in a consumption and preference of the rations with silage by pigs and poultry. Salmonella, E.coli, and Coliforms were not detected. Thus, the use of EM as an additive did not cause a mismatch in the classic silage process, although further studies should be carried out. Finally, the leachates obtained had contents of 320 mg N/l, 1005 mg P/l and 3610 mg K/l.

Key words: Effective microorganisms, organic waste, anaerobic fermentation, ensilage, animal feed

Índice general

Índice general	VII
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	IX
1 Introducción	1
1.1 Motivación	2
2 Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.1.1 Objetivos específicos	3
3 Revisión bibliográfica	5
3.1 Ensilaje	5
3.1.1 Ensilado químico	5
3.1.2 Ensilado biológico	6
3.1.3 Ensilabilidad de la materia prima	7
3.1.4 Indicadores de calidad nutritiva	8
3.1.5 Indicadores de calidad fermentativa	9
3.1.6 Lixiviados	9
3.1.7 Palatabilidad	10
3.2 Microorganismos eficientes (EM)	10
3.2.1 Principales especies en los EM y sus funciones	11
3.2.2 Estado actual de los EM y su comercialización	13
3.2.3 Usos de EM en la agricultura	13
3.3 Uso de EM en la explotación animal	14
3.3.1 Estudios de la aplicación de EM en la explotación animal	15
3.3.2 Uso de EM en vertederos	16
3.4 Bokashi y compostaje	16
3.5 Normativa de alimentación animal	17
4 Metodología	19
4.1 Aditivo: Activación de EM-1	19
4.2 Materia prima para el ensilado	21
4.3 Microsilos	23
4.4 Ensilabilidad de los residuos orgánicos	23
4.4.1 Análisis de la materia seca (%)	23
4.4.2 Análisis de los azúcares solubles	24
4.4.3 Determinación de la capacidad tampón	27
4.4.4 Análisis de nitratos y nitritos	27
4.5 Calidad fermentativa del ensilado	27
4.5.1 Determinación del N soluble y N amoniacal	27
4.5.2 Determinación de ácidos grasos volátiles y ácido láctico	28
4.6 Calidad nutritiva del ensilado	29
4.6.1 Toma de muestras en el silo experimental	29
4.6.2 Análisis del pH	29

4.6.3	Análisis de la materia seca (%)	30
4.6.4	Análisis de cenizas (% MS)	30
4.6.5	Análisis de FAD, FND y LAD (% MS)	30
4.7	Análisis de patógenos	31
4.8	Análisis de palatabilidad	31
4.9	Análisis de lixiviados	32
5	Resultados	37
5.1	Estudio de la ensilabilidad de los residuos orgánicos	37
5.2	Estudio de la calidad nutritiva del ensilado	38
5.3	Estudio de la calidad fermentativa del ensilado	40
5.4	Estudio de la palatabilidad	41
5.4.1	Cerdos de engorde	41
5.4.2	Gallinas ponedoras	42
5.5	Estudio de patógenos	42
5.6	Estudio del potencial de los lixiviados como fertilizante	43
6	Conclusiones y recomendaciones	45
6.1	Conclusiones	45
6.2	Recomendaciones	47
	Bibliografía	49
<hr/>		
	Apéndice	
A	Nomenclatura	53

Índice de figuras

3.1	Cambios en la microflora durante el proceso de ensilado.	6
3.2	Pérdidas durante el ensilado.	10
3.3	Bacterias fotosintéticas.	11
3.4	Bacterias ácido lácticas.	12
3.5	Levaduras.	12
3.6	Contraste entre plantas de arroz cultivadas con (derecha) y sin (izquierda) EM.	13
3.7	Bombeo de EM sobre vertedero de Tailandia.	16
4.1	Melaza de caña utilizada.	19
4.2	Soluciones EM-a en proceso de activación.	20
4.3	Muestras de soluciones EM-a activadas.	20
4.4	Soluciones EM-a almacenadas.	21
4.5	Residuos orgánicos listos para ensilar.	21
4.6	Microsilo.	23
4.7	Recta de calibrado azúcares totales.	25
4.8	Espectrofotómetro HACH.	28
4.9	Esquema de toma de muestras en silos verticales.	29
4.10	Vista aérea de la granja Paso Blanco.	32
4.11	VARIAN AA-240Z	35
5.1	Calidad fermentativa esperable en los ensilados según la relación de los parámetros que definen la ensilabilidad.	38
5.2	Estabilidad de un ensilado en función de la materia seca y su pH.	39
5.3	Prueba del primer bocado en cerdos de engorde	41
5.4	Prueba de consumo en cerdos de engorde	41
5.5	Prueba del primer bocado en gallinas ponedoras	42
5.6	Prueba de consumo en gallinas ponedoras	42

Índice de tablas

3.1	Valores de calidad fermentativa en ensilado.	9
3.2	Directrices para el uso de bokashi en alimentación animal.	15
3.3	Indicadores de un buen ensilaje.	18
4.1	Porcentajes para elaborar EM-a.	19
4.2	Materia prima para el ensilado de acuerdo con la clasificación del REGLAMENTO No. 68/2013.	22

4.3	Patrones recta de calibrado de azúcares solubles.	26
4.4	Asorbancia de la muestra.	26
4.5	Patrones recta de calibrado de fósforo.	34
5.1	Ensilabilidad del ensilado.	37
5.2	Calidad nutritiva del ensilado.	38
5.3	Calidad fermentativa del ensilado.	40
5.4	Valores de calidad fermentativa en ensilado.	40
5.5	Presencia de patógenos en el ensilado.	42
5.6	Contenido NPK en lixiviados.	43
5.7	Porcentajes NPK en lixiviados.	43
5.8	Rango de contenidos de nutrientes típicos en fertilizantes multinutrientes.	43
5.9	Grados de fertilizantes multinutrientes típicos.	44
6.1	Contenido NPK en lixiviados.	46
6.2	Porcentajes NPK en lixiviados.	46
6.3	Rango de contenidos de nutrientes típicos en fertilizantes multinutrientes.	47

CAPÍTULO 1

Introducción

La Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias, desde el año 2007, tiene como una de sus prioridades aumentar la autosuficiencia en materia de alimentación animal en las islas [1]. Esto se hace vigente también en el Plan de Acción de la Estrategia Europa 2020 en Canarias, adaptación de la comunicación *EURO-PA 2020. Una estrategia para el crecimiento inteligente, sostenible e integrador* de la Comunidad Europea, y la cual propone tres prioridades a seguir: crecimiento inteligente, sostenible e integrador. En dicho plan de acción se visiona un futuro más autosuficiente en las islas, con una menor producción de residuos y una mejor gestión de los mismos. Además, registros del 2008 dictaminan que sólo se produce en Canarias el 0,56 % del consumo animal [2].

Entorno a la mejora de la autosuficiencia de las islas respecto a la alimentación animal se han realizado varios estudios de manos del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Los más destacados, centrados en el aprovechamiento de subproductos agroindustriales como son el plátano de destrío, restos del sector tomatero, sueros de quesería y los restos de la vinificación [1]. Pero además de los productos agroindustriales, existen los biorresiduos generados en domicilios, en comercios, en equipamientos y servicios municipales y en actos públicos (biorresiduos domésticos) [3]. Estudios realizados en la Región Metropolitana de Barcelona señalan que se producen de media 477 gramos por día y persona tan sólo de biorresiduos domésticos [4]. En el caso de hoteles (de 2 a 4 estrellas) por ejemplo, los valores se sitúan entorno a los 0,8 kg de biorresiduos por pernoctación [3]. Una cantidad de residuos que no son para nada despreciables. Antaño, este tipo de residuos eran muchas veces reutilizados para la alimentación animal directa o bien para enriquecer la tierra. En cambio, a día de hoy, las transformaciones realizadas a nivel autonómico o estatal se limitan a tres tratamientos principales tras su génesis:

- Depósito en vertedero
- Incineración
- Tratamiento biológico (biometanización o compostaje)

El primero de los tratamientos es sin duda el menos deseado, y más cuando nos movemos en ámbito insular debido al reducido espacio de las islas y su masificación. Son muchas las toneladas de residuos que se generan día a día, y los vertederos a pesar de construirse con una previsión de crecimiento poblacional, tienen fecha de cierre. Sin embargo, a pesar de que se pueden ampliar, el impacto ambiental es enorme. Se ve afectada la calidad del suelo, el paisaje, la calidad del aire, la flora y la fauna del lugar. Entre todos los residuos depositados en vertedero, los más dañinos son sin duda los orgánicos, pues

la descomposición de éstos emite gases indeseados. En los últimos años se ha tenido hacia una estabilización de los residuos orgánicos mediante la adición de reactivos con tal de reducir los efluentes hacia el medio ambiente y mejorar las condiciones de los residuos durante su almacenaje.

Por otro lado, la incineración, como valorización energética es más interesante que el depósito en vertedero, ya que se consigue algo de interés a partir de residuos. No obstante, durante este proceso se producen gases de combustión y cenizas, entre otros efluentes no deseados. Hoy en día muchos de los residuos insulares como son los cadáveres de animales son transportados hacia península para su incineración.

En última instancia, dentro de la gestión estatal o autonómica de residuos, nos encontramos con el tratamiento biológico. Éste propone un reciclaje de los residuos para obtener otros productos como son los biogases o el abono orgánico.

Sin embargo, en el ámbito de las Islas Canarias, la gestión de residuos es pobre. Tan sólo se realiza recogida selectiva de fracción orgánica en la isla de La Palma. El destino de éstos es el vertido controlado en vertedero para los residuos orgánicos domésticos y comerciales, en cambio para los residuos vegetales de poda e industria maderera se produce compost.

En esta memoria se pretende estudiar una alternativa a los tres procesados clásicos de biorresiduos que se llevan a cabo a nivel autonómico. La alternativa del presente estudio se basa en la valorización de estos residuos orgánicos como suplemento alimenticio animal mediante ensilado y el uso de Microorganismos Eficientes (EM) como inóculo. Se pretende dar un valor añadido a los residuos orgánicos, haciendo que el proceso de descomposición se vea reducido a mínimos y con valor probiótico gracias a la fermentación producida. Dado que el aditivo utilizado para el ensilado (EM) es una combinación de microorganismos que incluye además de las bacterias acidolácticas (las bacterias clásicas para el ensilado), levaduras y bacterias fotosintéticas; se comprobará si ésta combinación tiene efectos adversos en la producción del ensilaje (fermentación láctica). Además, se determinará el potencial de los lixiviados producidos como fertilizante.

1.1 Motivación

La idea de valorizar los residuos orgánicos de cocina de una forma alternativa a las habituales (incineración y compostaje), nace de la creciente necesidad por reducir la generación de residuos y/o su valorización, dentro de la sociedad actual. Además, pude comprobar como esa necesidad se acentúa en un ámbito insular como es el de las Islas Canarias, donde la actividad comercial más importante es el turismo. La combinación del turismo, la limitación territorial de las islas, la generación inmensa de residuos y la mala gestión de éstos últimos hace que muchos de los desechos deban ser llevados a vertederos o incineradoras de la península ibérica.

Durante mi estancia SICUE (Sistema de Intercambio entre Centros Universitarios de España) de un curso completo, que no es más que un programa de intercambio nacional de estudiantes, en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) ha surgido una preocupación sobre esta necesidad cada vez más acentuada de una economía circular.

Por otra parte, el conocimiento de los beneficios de los Microorganismos Eficientes (inóculo microbiano resultante de la combinación de bacterias ácido lácticas, fotosintéticas y levaduras) impulsó el estudio de esta valorización alternativa.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto es estudiar la valorización de residuos orgánicos de cocina como suplemento alimenticio animal mediante el ensilaje y el uso de Microorganismos Eficientes (EM) como aditivo.

2.1.1. Objetivos específicos

- Estudiar los efectos del aditivo en el proceso del ensilado.
- Estudiar la palatabilidad del ensilado producido en cerdos de engorde y gallinas ponedoras.
- Estudiar el potencial de los lixiviados como fertilizante.

CAPÍTULO 3

Revisión bibliográfica

3.1 Ensilaje

El ensilaje o ensilado es un proceso de conservación de forrajes u otros alimentos con un contenido en humedad relativamente alto, de forma anaerobia y aislado de la luz y la humedad exterior. Esto se realiza mediante la acidificación del mismo, que impide que se desarrolle la vida vegetal y microbiana indeseable [5].

La finalidad del ensilaje es la conservación de los forrajes o alimentos con una pérdida mínima de materia seca y nutrientes, pero logrando que el ganado no pierda apetecibilidad por el mismo y sin que se produzcan sustancias indeseables durante el proceso.

A pesar de sus condicionantes y contras, es una buena opción para los productores locales o pequeños agricultores, ya que es un proceso que no depende de las condiciones meteorológicas adversas ni requiere un mayor mantenimiento del mismo.

Esta acidificación se puede realizar de forma química o biológica. De forma que distinguimos entre dos tipos de ensilado: el químico y el biológico. En el primero las transformaciones del ensilado están a cargo de las enzimas de la materia prima gracias a la acidificación, mientras que en el ensilado biológico actúan los microorganismos.

3.1.1. Ensilado químico

El ensilado químico es producido mediante la adición de ácidos orgánicos y/o minerales a la materia prima (forrajes, alimentos, etc).

La materia prima se tritura, se adiciona el ácido (o los ácidos) y se homogeneiza la mezcla para que las enzimas ya presentes en la materia prima la digieran bajo condiciones favorables de medio ácido. Los ácidos más utilizados en el ensilado químico son los siguientes [6]:

- Ácido fórmico.
- Ácido sulfúrico.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido propiónico.
- Mezcla de ácido acético, fórmico y fosfórico.
- Mezcla de ácido fórmico y sulfúrico.
- Mezcla de ácido propiónico y sulfúrico.

3.1.2. Ensilado biológico

El ensilado biológico es aquel que se basa en la degradación de parte de la materia prima del ensilado en ácidos mediante la acción de microorganismos, de manera que se conserva el ensilado de forma anaerobia durante meses con pérdidas mínimas de materia seca y nutrientes. El aditivo biológico más usado son las bacterias ácido lácticas.

Los procesos fermentativos que se producen durante el ensilado son los que se detallan a continuación [7]:

Fermentación acética: Una vez que las células vegetales del ensilado mueren, se desarrollan bacterias coliformes de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias no son deseadas en el ensilado, puesto que producen ácido acético a partir del ácido láctico. La temperatura óptima para el desarrollo de coliformes está comprendida entre los 18-25°C, mientras que ante un pH menor que 4,2 desaparece su actividad.

Este tipo de bacterias pueden presentar actividad sólo durante la fase inicial del ensilaje, si este se realiza de manera correcta. Progresivamente, los cocos lácticos los sustituyen (*Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*).

Fermentación láctica: Es la transformación química deseada. Las bacterias ácido lácticas degradan los azúcares y carbohidratos solubles presentes en la materia prima del ensilado hasta ácido láctico.

A medida que la fermentación transcurre, los cocos lácticos que habían reemplazado las bacterias coliformes serán sustituidos por *Lactobacillus* (a excepción de los *Pediococcus*, que toleran mejor la acidez).

Las bacterias que procesan el ácido láctico se desarrollan en un medio con pH de 3-4, bajo condiciones anaerobias.

Una vez los azúcares solubles y los carbohidratos escasean y el ácido láctico se acumula, su acción se ve inhibida. Una vez esto ocurre, la materia prima ha quedado estabilizada y se ha convertido en ensilado.

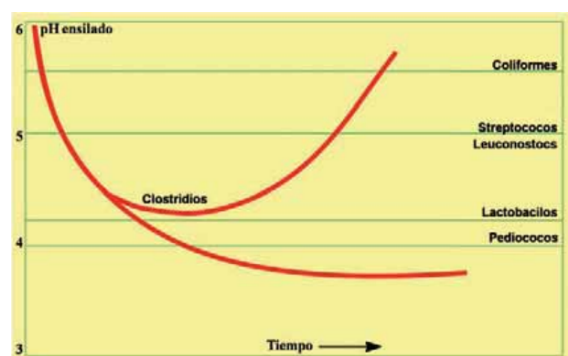


Figura 3.1: Cambios en la microflora durante el proceso de ensilado.

FUENTE: The silage fermentation [8]. 1984.

Fermentaciones secundarias: Son los procesos metabólicos no deseados y deben ser controlados. La más perjudicial y peligrosa de las fermentaciones secundarias es la butírica, producida por las bacterias del género *Clostridium*. Su mayor actividad se desarrolla en temperaturas de entre 20 y 40°C, pero requieren de un pH mayor que 4. Algunas especies (proteolíticas) transforman el nitrógeno protéico de la materia prima en ácido butírico y amoníaco. Otras especies como las sacarolíticas, degradan los azúcares y el mismo ácido láctico hasta ácido butírico, acético, propanoico, etanol, butanol y otros metabolitos en una cantidad menor [9].

El amoníaco producido por las mencionadas bacterias tiende a elevar el pH en el silo. Esto favorece el desarrollo de especies del género *Bacillus*, que a su vez producen más amoníaco. Cuando el pH sube hasta valores iguales o superiores a 5, el crecimiento de éstos microorganismos y otros indeseables que aceleran la putrefacción en el silo. Esta clase de bacterias se encuentran en la tierra y en el estiércol.

Además de la fermentación butírica se pueden producir las fermentaciones propiónica, etanólica, acética. La fermentación alcohólica hay que procurar reducirla todo lo posible, ya que aunque afecta poco al proceso de ensilado, puede alterar su conservación [9].

3.1.3. Ensilabilidad de la materia prima

La calidad fermentativa en el proceso de ensilado depende de la naturaleza del forraje de partida y del correcto desempeño de la técnica. La ensilabilidad depende de los siguientes factores, de acuerdo con de la Roza [9]:

- **Materia seca**
- **Azúcares solubles**
- **Capacidad tampón**
- **Contenido en nitratos**

Cuando la materia prima para el ensilado tiene una **materia seca** igual o inferior al 15 %, el desarrollo de los Clostridios es muy difícil de inhibir, puesto que un medio con alto contenido en humedad es favorable para ellos. De modo que para asegurar una fermentación bien realizada y evitar pérdidas por los efluentes, el porcentaje óptimo de materia seca en la materia prima para ensilar es del 25 % como mínimo. Con un contenido de materia seca inferior al 25 % se obtienen ensilados de baja calidad nutritiva, debido a pérdidas por efluentes, además de favorecer el desarrollo de bacterias indeseadas.

Por lo que hace a los **azúcares solubles** (AS), recurso que utilizan las bacterias formadoras de ácido láctico mediante el cual se obtiene un pH bajo, debe ser superior al 15 % sobre materia seca.

La **capacidad tampón** (CT) es la resistencia que opone el material a las variaciones de pH del medio mediante selectos compuestos químicos. Es un parámetro que se expresa en términos de miliequivalentes de álcali por kilogramo de materia seca (meq NaOH/kg MS) necesarios para hacer variar el pH en dos unidades (de pH = 4 a pH = 6), después de eliminarse los bicarbonatos que pueden actuar como tampón.

Cuando se evalúa la capacidad tampón en el rango de pH 4-6, alrededor de un 75 % de ésta cualidad se atribuye a las sales de los ácidos orgánicos, sulfatos, nitratos, ortofosfatos y cloruros; mientras que el 25 % restante se atribuye a las proteínas.

Los valores clásicos de capacidad tampón oscilan entre 200 y 1000 meq NaOH/kg MS. Aunque para una buena acidificación de la materia prima se requiere de una capacidad tampón inferior a 350 meq NaOH/kg MS [10].

El coeficiente de fermentabilidad (CF) es un indicador de la aptitud de la materia prima como potencial ensilado. La ecuación que define este parámetro es la siguiente [9]:

$$CF = MS + 8 \cdot AS / CT \quad (3.1)$$

En donde:

MS = Porcentaje de materia seca (% m/m)

$AzSol$ = Porcentaje de azúcares solubles sobre MS (% m/m)

CT = Capacidad tampón en meq $NaOH/100g$ MS

Se considera que a partir de un CF superior a 30 es una buena materia prima para ensilar [9].

El contenido en nitratos, si es elevado, perjudica a la conservación del ensilado. A pesar de que puede hacer aumentar el contenido en materia seca, a su vez disminuye la cantidad de azúcares solubles disponibles y provoca un aumento en el pH del ensilado y en el nitrógeno amoniacal.

Según Woolford [8], los nitratos afectan al ensilado de tres maneras:

- Los nitratos y azúcares solubles se correlacionan de forma negativa.
- Durante el ensilado se forman nitritos al reducirse los nitratos, inhibiendo la formación de ácido butírico.
- La reducción de nitratos provoca un aumento en el pH.

Gracias al esfuerzo de investigadores españoles [11], se ha podido elaborar un índice de ensilabilidad que permite identificar la disposición de una materia prima al ensilado.

La expresión que relaciona los parámetros que indican la disposición de la materia prima a ser ensilada es la siguiente:

$$\text{Índice de ensilabilidad (IE)} = 152,29 - 1,97MS + 0,85AzSol - 3,75CT \quad (3.2)$$

En donde:

MS = Porcentaje de materia seca (% m/m)

$AzSol$ = Porcentaje de azúcares solubles sobre MS (% m/m)

CT = Capacidad tampón en meq $NaOH/100g$ MS

3.1.4. Indicadores de calidad nutritiva

La calidad nutritiva del ensilado viene condicionada en su mayor parte por la materia prima utilizada. Partiendo de esa base, y según las técnicas de recolección, procesado y conservación se obtendrá un buen producto o en su defecto, resultados negativos.

Las determinaciones analíticas mínimas necesarias según los criterios que se aplican en el Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA, para poder valorar la calidad nutritiva del ensilado son las siguiente [5]:

- El **pH** es un parámetro que nos da información sobre el tipo de fermentación que se ha llevado a cabo de manera inmediata. Por ende, nos indica si el alimento es estable.
- La **materia seca** es la cantidad de materia prima que no es agua. Los demás componentes siempre serán expresados sobre materia seca.
- El contenido en **cenizas** indica el contenido mineral. En forrajes, un contenido mayor al 15 % supone una contaminación con tierra.

- La **proteína** es un parámetro importante ya que influye directamente en la producción animal.
- La **fibra Neutro Detergente (FND)** es un indicador del grado de madurez del ensilado, a mayor contenido en FND, mayor madurez.
- La **digestibilidad** es un valor aproximado de la fracción de ensilado que es consumido por los animales y no excretado. Se puede medir de forma directa con el ganado, estimando en laboratorio utilizando enzimas que simulan la digestión rumiante o bien haciendo una aproximación matemática.

3.1.5. Indicadores de calidad fermentativa

En un ensilado, no hay que evaluar tan sólo su valor nutritivo. También hay que evaluar si la fermentación ha sido la deseada y por tanto, el alimento será estable. Según el CIATA (Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria) [12], los parámetros que determinan la calidad de la fermentación son los siguientes:

Tabla 3.1: Valores de calidad fermentativa en ensilado.
FUENTE: CIATA [12]. 1998.

Calidad	N soluble (%N total)	N amoniacal (%N total)	Ácidos grasos volátiles (%MS)	Ácido acético (%MS)	Ácido láctico (%MS)	Ácido butírico (%MS)
Excelente	<50	<7	<4	<2	>3	Ausencia
Buena	50-60	7-10	4-7	2-4	1,5-3	Trazas
Mediocre	60-65	10-15	7-10	4-5,5	1,5-0,5	<0,5
Mala	>65	15-20	10-13	5,5-7,5	>0,5	>0,5
Muy mala	>75	>20	>13	>7,5	Ausencia	>0,5

El N soluble y amoniacal, es una medida de la degradación de la proteína en el ensilado. La escasez de azúcares solubles al cabo de los meses es indicadora de una buena fermentación láctica. El ácido láctico, producto de la fermentación deseada, es sinónimo de buen ensilado. La ausencia o trazas de ácidos acético, butírico, u otros son también indicadores de una buena fermentación.

En la expresión de los contenidos de materia seca, cenizas, proteína y fibra no se tuvo en cuenta la pérdida de volátiles durante el secado de las muestras en estufa.

3.1.6. Lixiviados

El método del ensilado como método de conservación de la materia prima, conlleva pérdidas inevitables que afectan a la digestibilidad del producto final, disminuyendo el valor nutritivo del mismo. Las posibles pérdidas están delimitadas a día de hoy. Dependen de la naturaleza de la materia prima, de la respiración celular, de los procesos fermentativos, de la producción de efluente (lixiviados y gases) y del deterioro aeróbico [9]. Las pérdidas pueden dividirse en dos tipos (Figura 3.2): evitables e inevitables. Las evitables siempre estarán relacionadas con la técnica del ensilado. Un ensilaje bien realizado evitará en gran medida las pérdidas.

Mientras que para contenidos en materia seca bajos (<20 %) se producen pérdidas de materia seca de incluso el 30 % del total y se generan grandes volúmenes de lixiviados

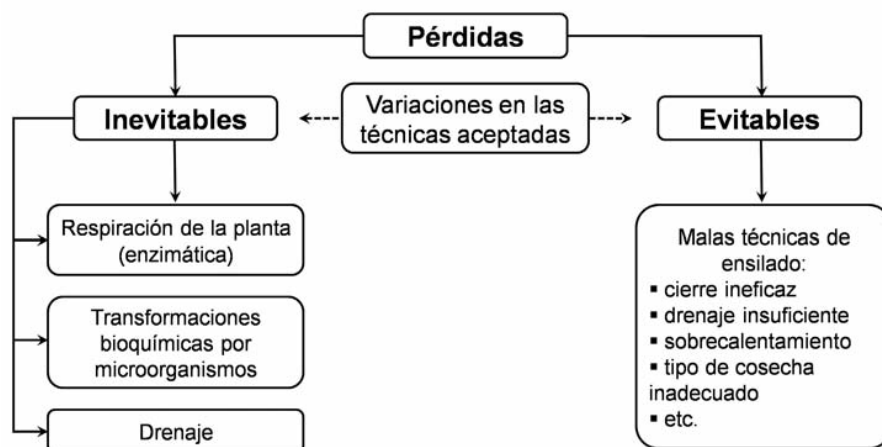


Figura 3.2: Pérdidas durante el ensilado.
FUENTE: El libro del ensilado [9]. 2014.

(por donde se pierden nutrientes que dejan de estar disponibles para la fermentación), cuando el contenido en materia seca es superior al 25 %, las pérdidas se minimizan [9].

El volumen de lixiviados producidos puede oscilar desde valores inapreciables hasta más de 200 L/t de materia prima. Estas pérdidas tienen lugar en su gran mayoría durante los primeros días del ensilado [9].

3.1.7. Palatabilidad

La palatabilidad es la cualidad de ser grato al paladar un alimento. Si un alimento presenta una mala palatabilidad en el ganado, se debe contemplar otro tipo de alimento para los animales. Ligado a la palatabilidad está el consumo, ya que a mayor apetecibilidad, más consumo tendrá el animal. Además, el consumo de alimento por parte del ganado afecta directamente a su productividad. Por ello es importante estudiar la palatabilidad de los alimentos antes de cambiar la dieta.

Los métodos utilizados para medir la palatabilidad animal van desde pruebas de consumo (o de aceptabilidad) hasta pruebas de preferencia, según lo descrito por Forbes [13]. A pesar de que hoy en día el método más usado para determinar la palatabilidad es el estudio del consumo, en los últimos años se han realizado estudios basándose en la reactividad al sabor de los animales. Ésta se basa en analizar las expresiones oro-faciales del animal en estudio durante el consumo [14, 15].

La prueba de preferencia se basa en hacer escoger al animal entre la ración habitual y la sometida a la prueba. Para la prueba de consumo, en cambio, se mide la cantidad de comida ingerida [16].

3.2 Microorganismos eficientes (EM)

Los Microorganismos Eficientes (EM) es una mezcla de especies selectas de microorganismos beneficiosos (bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias fotosintéticas, por orden de predominancia) [17]. La concentración de la mayoría de estos microorganismos en la fase líquida comprende un rango entre 1×10^6 y 1×10^8 microorganismos por mililitro [18]. Esta mezcla de EM fue descubierta por Teruo Higa a principios de los años sesenta [17].

Los microorganismos beneficiosos son aquellos que fijan el nitrógeno atmosférico, descomponen residuos y restos orgánicos, eliminan patógenos transmitidos por el suelo, reciclan y aumentan los nutrientes disponibles por las plantas, degradan tóxicos presentes en pesticidas, producen antibióticos, forman complejos químicos con metales para limitar la captación de estos últimos por las plantas y solubilizan nutrientes que por su naturaleza serían insolubles, entre otros. Por otra parte, los microorganismos patógenos son aquellos que inducen a las plantas a tener enfermedades, estimulan la propagación de patógenos a través del suelo, retienen nutrientes necesarios por las plantas, inhiben la germinación de las plantas y su desarrollo y producen sustancias fitotóxicas [17].

A continuación se presentan las especies predominantes en los EM, junto a sus funciones y sus correlaciones.

3.2.1. Principales especies en los EM y sus funciones

Bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomonas spp*)

Las bacterias fotosintéticas o fototróficas (Figura 3.3) son un grupo de microorganismos independientes y autosuficientes con la capacidad de sintetizar sustancias útiles a partir de gases perjudiciales como el sulfato de hidrógeno, de materia orgánica y de las sustancias segregadas por las raíces. Entre las sustancias que son capaces de generar estos seres nos encontramos los aminoácidos, sustancias bioactivas y los ácidos nucleicos. Estas sustancias ayudan a las plantas a aumentar su crecimiento y desarrollo [19].



Figura 3.3: Bacterias fotosintéticas.
FUENTE: EMRO USA [20]. 2017.

Para desarrollar esta función, estos microorganismos utilizan la luz solar y el calor del suelo como fuentes de energía.

Los productos sintetizados por las bacterias fotosintéticas son absorbidas por las plantas directamente como sustrato, incrementando así las poblaciones de microorganismos beneficiosos.

Un ejemplo claro de la función de estas bacterias es el que se propone desde el AP-NAN sobre los EM [19]. Las micorrizas vesicular-arbuscular (VAM) existentes en la parte del suelo inmediata a las raíces vivas (rizosfera) aumentan. Esto es debido a que hay un aumento de los compuestos nitrogenados (aminoácidos) los cuales son secretados por las bacterias fotosintéticas. Los VAM también son capaces de mejorar la solubilidad de los fosfatos en el suelo. De esta forma se consigue que las plantas puedan absorber el fosfato que de otra forma sería inaccesible para ellas.

Bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp*)

Las bacterias ácido lácticas (Figura 3.4) son productoras de ácido láctico. Como materia prima utilizan azúcares y otros carbohidratos sintetizados por las bacterias fotosintéticas y por las levaduras. Una de sus principales cualidades es que es un muy buen agente esterilizador, capaz de eliminar a microorganismos patógenos gracias a la producción del ácido láctico. Además, estas bacterias estimulan la descomposición de la materia orgánica de forma que tiende a la fermentación de compuestos como la celulosa y la lignina [19].

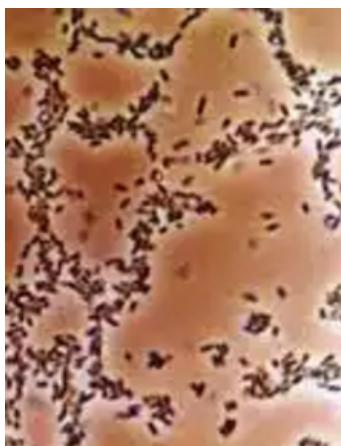


Figura 3.4: Bacterias ácido lácticas.
FUENTE: EMRO USA [20]. 2017.

Levaduras (*Saccharomyces spp*)

Las levaduras son capaces de producir sustancias antimicrobiales. Además, a partir de los aminoácidos y azúcares secretados por las bacterias fotosintéticas, raíces de plantas y materia orgánica, son capaces de sintetizar sustancias necesarias por la planta para su crecimiento. Estas biosustancias (enzimas, hormonas) promueven la división tanto de células como de raíces. Pero no es el único destino de éstas sustancias, ya que las bacterias ácido lácticas y las actinobacterias también se aprovechan de ellas.



Figura 3.5: Levaduras.
FUENTE: EMRO USA [20]. 2017.

3.2.2. Estado actual de los EM y su comercialización

En la actualidad, la patente del producto EM sigue perteneciendo al Dr. Teruo Higa, que decidió limitar el número de empresas certificadas por su organización, EMRO (EM Research Organization), a una por estado. [21]

Su comercialización por tanto, se produce a través de las empresas autorizadas por EMRO, siendo EMIKO (empresa alemana) la más importante en EUROPA.

Algunos de los productos que se pueden adquirir son los siguientes:

EM-1 Es la solución madre producida a partir de la receta original de Teruo Higa, desarrollada en 1980.

EM-2, EM-3, EM-4 Son soluciones de EM con diferentes concentraciones de las especies que en la mezcla inicial.

EM-a Es una dilución de EM activada a partir de EM-1.

EPF Es un extracto de plantas fermentadas que funciona como repelente de insectos y biofertilizante líquido.

EM-5 Se utiliza como repelente de insectos.

EM-X Gold Solución preparada para el consumo humano. Probiótico.

EM Cerámica Cerámica preparada con EM. Se utiliza para la purificación de aguas.

3.2.3. Usos de EM en la agricultura

Como se puede apreciar en los apartados anteriores, cada especie tiene su función. Las bacterias fotosintéticas se consideran el pilar de los EM, ya que actúan como soporte para el resto de microorganismos, además de nutrirse con los productos de éstos. Se conoce a esta relación como *coexistencia y coprosperidad* [19].

La aplicación en los suelos de los EM promueve la aparición y desarrollo de microorganismos beneficiosos, que desarrollan una simbiosis con las raíces de las plantas a través de la rizosfera. Esto provoca que los microbios perjudiciales se reduzcan considerablemente, junto con las enfermedades que vienen asociadas a ellos. Es por ello que las plantas se desarrollan gratamente en suelos con Microorganismos Eficientes (Figura 3.6). Además, gracias a las biosustancias producidas por los EM, las lombrices son atraídas hacia la zona [19].



Figura 3.6: Contraste entre plantas de arroz cultivadas con (derecha) y sin (izquierda) EM.
FUENTE: APNAN [19]. 1999.

Hussain [22], realizó un estudio de larga duración en campos de Faisalabad, Pakistán; con tal de determinar los efectos del uso de EM en un cultivo de arroz y trigo. Los diferentes tratamientos fueron el control (sin tratamiento), abono químico recomendado (NPK), estiércol verde (GM), abono de corral (FYM), EM, y las combinaciones de NPK + EM, GM + EM, y FYM + EM. Los resultados mostraron que entre las parcelas tratadas con sólo uno de los tratamientos, se obtuvieron rendimientos, de mayor a menor, en este orden: NPK > GM > FYM > EM > Control. Sin embargo, cuando se aplicaron los tratamientos combinados con EM, se obtuvieron rendimientos aún mejores, en este orden: NPK+EM > GM+EM > FYM+EM [22].

Otro estudio fue realizado en China durante 11 años, desde 1993; por Hu y Qi [23], en la China Agricultural University. El estudio comprendió tres tratamientos sobre cultivos de trigo; el primero consistió en la aplicación de compost hecho con EM, el segundo tuvo como aplicación compost tradicional y el tercero fue el control, sin fertilizar. Los resultados a largo plazo mostraron que la aplicación de compost con EM aumentó significativamente la biomasa de la paja de trigo, los rendimientos de grano, y la absorción de nutrientes en la paja mejoró la absorción de nutrientes tanto en la paja como en el grano de trigo en comparación con el compost tradicional y el control. Así mismo, los resultados mostraron también una diferencia significativa de estos parámetros del tratamiento con compost tradicional ante el control [23].

Se han realizado diversos estudios sobre los efectos de los EM en el suelo y la vegetación. La mayoría reportan un efecto beneficioso [24, 25, 26, 22, 23], sin embargo cabe decir que hay una minoría que indica que los EM no han surgido efecto [27, 28].

3.3 Uso de EM en la explotación animal

La explotación ganadera es uno de los sectores que causa más contaminación y enfermedades. Es por ello que se requiere de unos medios y controles de higiene determinados.

Con el uso de EM se podrían solventar varios de los problemas surgidos a partir de esa premisa. Según el *Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms* [19], los EM son capaces de eliminar malos olores y, en consecuencia disminuir drásticamente el número de moscas y/o insectos indeseados; mejorar la salud de los animales y su fertilidad, aumentar la resistencia de los animales frente a enfermedades y mejorar la calidad del estiércol animal.

Uso de EM en alimentación animal

Los EM no se añaden, como norma general, directamente a la dieta animal; sino que se utiliza bokashi¹. Esta materia orgánica fermentada por EM es introducida en la alimentación animal en un rango entre 1-5 %. Desde el documento *Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms* [19] se dan unas directrices (como referencia) para calcular el porcentaje a añadir de bokashi a la ración (Tabla 3.2).

Además, en el mismo documento se hace referencia al uso de EM en el agua de los animales. Se propone una dilución de EM en un rango entre 1:1000 - 1:5000, en función de la edad del animal. La mayor dilución se utilizará con animales más jóvenes. Se advierte que no se debe introducir el EM directamente a los animales adultos, ya que puede causarles problemas.

¹Materia orgánica fermentada con EM: palabra japonesa

Tabla 3.2: Directrices para el uso de bokashi en alimentación animal.
FUENTE: APNAN [19]. 1999.

Especie	Etapas	Porcentaje de bokashi
Gallina/Gallo - Producción de huevo	Pollo	1 - 3 %
	Adulto	1 %
Gallina/Gallo - Producción de carne	Pollo	2 - 3 %
	Adulto	1 %
Cerdo	Cría	1 %
	Lechón	1 - 3 %
	Lechón para carne	1 %
	Adulto para carne	0,5 - 1 %
Vaca - Producción de carne	Becerra	10 - 20 g al día con leche
	Novilla	30 - 50 g al día
	Adulta	30 - 50 g al día
Vaca - Producción de leche	Becerra	10 - 20 g al día con leche
	Adulta	50 - 100 g al día
Acuicultura	-	1 - 5 %

3.3.1. Estudios de la aplicación de EM en la explotación animal

Uno de los mayores problemas presentes en las explotaciones ganaderas o avícolas es la generación de malos olores producidos en las instalaciones por los residuos generados por los propios animales. Fue en China donde se realizó un estudio cooperativo de investigación con el International Nature Farming Research Center (Atami, Japón), para evaluar el uso de EM como inóculo microbiano para suprimir los malos olores generados por el estiércol de aves de corral [29]. Para ello se alimentaron a las aves adicionando EM sólo en la comida, sólo en la bebida o en ambas; comparando los resultados con controles sin EM. Los resultados mostraron que se redujeron notablemente los malos olores generados por las aves de corral, factor asociado con el descenso de NH_3 en los residuos (entre un 42 y el 70 % menos que los controles). También se registró un aumento del 28 % en los aminoácidos que contenían las raciones de comida inoculadas con EM. El uso de EM supuso, además, mejoras en el crecimiento de las aves y en su resistencia contra enfermedades [29].

Otro estudio realizado en Iraq evaluó el efecto de suplementar la bebida de pollos de engorde castrados en su salud y crecimiento. El proyecto se realizó sobre 30 pollos de engorde castrados de 60 días de edad, administrándoles 10 mililitros de EM por litro de agua durante cinco semanas. Los resultados mostraron un significativo efecto positivo en las ganancias de peso, un mayor consumo de raciones por parte de los pollos que consumían EM y una mayor conversión de la comida. Además, se identificó un aumento en el porcentaje de linfocitos [30].

Desde Bangkok se estudiaron también los efectos de los EM en la reducción de amoníaco, los rendimientos en el crecimiento, la reducción de Salmonella y Campylobacter y los cambios hematológicos en 594 gallinas de engorde. Las gallinas se dividieron en 3

grupos, el primer grupo fue el control, mientras que los grupos 2 y 3 recibieron EM en forma de spray en el suelo y en la bebida con una dilución 1:800, respectivamente. Los resultados concluyeron que las concentraciones de amoníaco disminuyeron significativamente entre el grupo 2 y el control. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias en los rendimientos de crecimiento ni en los cambios hematológicos. Las gallinas del grupo 3 mostraron un mayor consumo de alimento [31].

3.3.2. Uso de EM en vertederos

El uso de EM en vertederos abiertos al aire libre aporta beneficios para nada despreciables debido a la naturaleza de estos microorganismos. Los más interesantes son, sin duda, la eliminación de olores desagradables y la reducción de moscas.

Para ello, en lugares como Tailandia (Figura 3.7), se bombea una dilución 1:100 de EM-a sobre los montículos de desechos con una relación del 10-30 % de humedad en volumen respecto a los residuos. Esta primera dilución se aplica cada cierto tiempo de forma regular hasta que desaparece el olor. Luego, se aplica la dilución de EM cada vez que llegan más residuos.



Figura 3.7: Bombeo de EM sobre vertedero de Tailandia.
FUENTE: APNAN [19]. 1999.

3.4 Bokashi y compostaje

Como ya ha sido mencionado antes, *bokashi* es un término japonés que significa materia orgánica fermentada con EM. A pesar de que la materia no se descompone tan bien como con los métodos de compost tradicional, el bokashi se puede obtener en un plazo de 4-10 días [19]. Este tipo de proceso se realiza en medio anaerobio, para asegurar que la fermentación sigue el camino adecuado y se conserva toda la materia orgánica posible.

Esto se hace visible en el documento de investigación *Fermentation versus composting* [32], donde después de experimentar con el método fermentativo del bokashi a la par que con el compost tradicional (sobre restos orgánicos), se llegaron a las siguientes conclusiones. 1) Los nutrientes se retienen en mayor cantidad tras el proceso de fermentación que por la vía del compost tradicional. 2) Mientras que el compost tradicional requería de ser mezclado periódicamente, no era necesario por la vía del bokashi. 3) La fermentación se produjo a una temperatura comparable a la ambiente, mientras que durante el proceso del compost se llegó a los 60,5°C. 4) Después del proceso de compost tradicional, se redujo la materia orgánica un 58,0 %, mientras que por la vía fermentativa se mantuvo un

97,6 %. 5) La huella de CO₂ es mucho menor en el método del bokashi que en el método del compost tradicional (27 veces menor).

Además, la aplicación de bokashi al suelo le proporciona un medio a los EM para su inmediato desarrollo [19], desarrollando todos los beneficios nombrados anteriormente en este documento.

3.5 Normativa de alimentación animal

Para la elaboración de piensos para alimentación animal se debe contemplar el marco legal establecido por la Unión Europea, el Estado Español y la normativa de la comunidad autónoma si procediese.

Por ende, la normativa de aplicación de este proyecto será la siguiente:

- Reglamento nº 68/2013 de la comisión de 16 de enero de 2013 relativo al Catálogo de materias primas para piensos.
- Reglamento nº 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se fijan requisitos en materia de higiene en los piensos.
- Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal.
- Directiva 2006/13/CE de la comisión de 3 de febrero de 2006.
- Reglamento nº 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de julio de 2009 sobre la comercialización y utilización de los piensos.
- Normas SILUM sobre alimentación animal.

Ninguno de los residuos orgánicos utilizados en este trabajo fin de grado están prohibidos para su uso en alimentación animal según las normas fijadas por SILUM (Sistema de Gestión Integral de la Alimentación Animal estatal), puesto que no aparecen en el listado de sustancias indeseables.

Además, estos restos aparecen como autorizados como materia prima para piensos según el Reglamento 68/2013 de la Comisión de 16 de enero de 2013 relativo al Catálogo de materias primas para piensos.

El pienso o ensilado producido no es de origen industrial o con fines comerciales, por lo que no tiene porqué cumplir con los requisitos establecidos por el Reglamento nº 183/2005 de enero de 2005 sobre los requisitos en materia de higiene en los piensos. Sin embargo, se han seguido los principios/requisitos del mismo.

Los requisitos que figuran en el reglamento anteriormente nombrado se pueden simplificar en que el pienso debe ser inocuo por lo referente a la fabricación, comercialización e higiene del mismo. Es necesario indicar la composición del producto a nivel analítico (proteína, materia seca, cenizas, etc), la ausencia de patógenos (Salmonella, E. coli, etc.) y que no contiene sustancias indeseables.

Según Montesinos [33], en armonía con la normativa descrita, al utilizar una materia prima libre de sustancias indeseables, las únicas sustancias o microorganismos indeseables serían aquellas producidas por un mal ensilaje.

Para el seguimiento de un buen ensilaje son determinantes los siguientes factores [34]:

Tabla 3.3: Indicadores de un buen ensilaje.
FUENTE: INRA [34]. 1981.

Ítem	Explicación
pH	Un pH situado entre 3 y 4, en condiciones anaerobias, nos asegura una ausencia de patógenos en el ensilado.
Contenido en ácido láctico	Un contenido en ácido láctico superior al 1,5-3 % es indicador de un ensilado bien fermentado.
Contenido en ácido butírico	La ausencia o trazas de ácido butírico es indicador de un ensilado bien fermentado.
Contenido en ácido acético	Un contenido en ácido acético entre 0,5-1 % es indicador de un ensilado bien fermentado.
Contenido en ácido propanoico	La ausencia o trazas de ácido propanoico es indicador de un ensilado bien fermentado.
Nitrógeno amoniacal respecto al nitrógeno total	Debe ser inferior al 5-10 %
Nitrógeno soluble respecto al nitrógeno total	Debe ser inferior al 50 %

Estos indicadores están detallados de forma más extensa en el apartado 3.1.5.

Se excluyen de este estudio los residuos peligrosos, no susceptibles de ser usados para alimentación animal. Se excluyen de la misma forma los subproductos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH).

CAPÍTULO 4

Metodología

4.1 Aditivo: Activación de EM-1

La solución EM-1 es una solución de microorganismos en estado latente, que requiere de activación. De este modo, se consigue multiplicar la población de EM, consiguiendo así un mayor rendimiento de la solución madre (EM-1).

Para la activación del EM-1 se siguieron las indicaciones del fabricante de EM-1, adaptadas de la página web de EMIKO [35], que se detallan a continuación. También se consultó a una distribuidora de EMIKO [36] y se contrastó con los trabajos de Xu, Javaid, Bajwa, Hussain y Hu. [24, 25, 26, 22, 23].

Para activar la solución EM-1 y conseguir EM-a se fermentó, con melaza de caña (Figura 4.1), la solución madre.



Figura 4.1: Melaza de caña utilizada.
FUENTE: Propia.

Para ello, las proporciones deben ser las que se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Porcentajes para elaborar EM-a.

Componente	Porcentaje v/v
Agua	94 %
EM-1	3 %
Melaza	3 %

Se escogió un fermentador opaco, con capacidad de ser sellado. Su volumen fue de un litro. El fermentador tenía un espacio extra para los gases generados, marcado para ser reconocido fácilmente, así como capacidad de purga.

Se empezó el proceso añadiendo agua caliente (superior a 40°C) hasta la mitad del fermentador. Posteriormente se añadió la melaza, y se removió la solución hasta que estuvo bien disuelta. Se añadió agua fría al fermentador hasta que la temperatura de la solución fuera de 35-40 °C.

Acto seguido se introdujo la solución de EM-1 en el fermentador. Por último se llenó el fermentador hasta la marca con agua a 35-40 °C.

Por último, se selló el fermentador y se proveyó de una fuente de calor para el óptimo desarrollo de los microorganismos durante 7 días. La fuente de calor se la proporcionó un baño de agua a 35°C controlado por un termostato (Figura 4.2).



Figura 4.2: Soluciones EM-a en proceso de activación.
FUENTE: Propia.

Para asegurar que la fermentación ha sido exitosa, el pH de las soluciones debe estar entre 3,2 y 3,8 [36], y deben presentar un olor agridulce, así como copos blancos en la superficie producto de colonias de levaduras [35].

Al cabo de 7 días, se revisaron los parámetros, que cumplieran con lo descrito por el fabricante. Además se comprobó que, en efecto, las soluciones tenían un olor agridulce similar al de la solución madre EM-1 y que presentaran copos blancos debido a la presencia de colonias de levaduras (Figura 4.3).

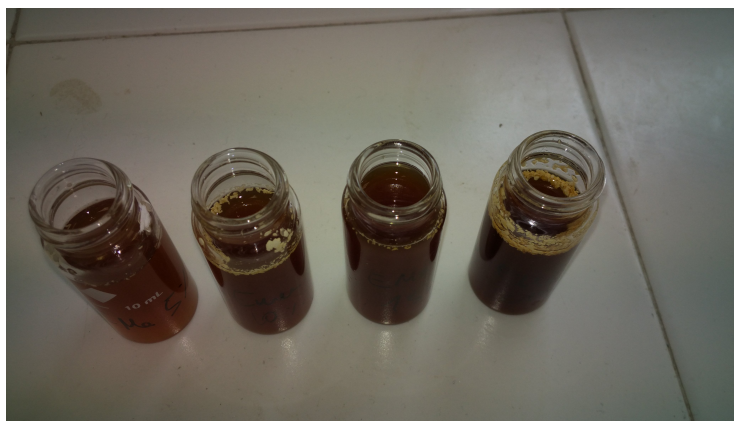


Figura 4.3: Muestras de soluciones EM-a activadas.
FUENTE: Propia.

Estas soluciones deben ser utilizadas antes de 7 días después de estar listas para su uso. Se almacenaron de forma que siguieran sin recibir luz y a temperatura ambiente de 25°C (Figura 4.4).



Figura 4.4: Soluciones EM-a almacenadas.
FUENTE: Propia.

La solución EM-a no debe ser multiplicada de nuevo, según las recomendaciones de los suministradores, ya que no se puede garantizar la misma composición en lo que a microorganismos se refiere. En condiciones de control deberían ser los mismos.

4.2 Materia prima para el ensilado

La materia prima utilizada en este estudio para elaborar ensilado fueron los desechos de cocina de diferentes comedores de la *Comunidad de las Hijas de la Caridad de San Vicente de Paúl*, de los comedores, colegios, residencias y obras sociales. Los desechos producidos en cocina se retiraron al momento de ser generados y se trituraron inmediatamente después para ser ensilados.

Consultando el catálogo de materias primas para piensos, se separaron todos los posibles ingredientes, de manera que se usaron componentes para el ensilado pertenecientes a los siguientes grupos de dicho catálogo (Tabla 4.2):

Como ya se ha detallado, los desechos fueron recogidos después de su génesis, para acto seguido ser llevados al laboratorio, triturados, homogeneizados, inoculados y ensilados. Además, se hicieron los análisis pertinentes, detallados más adelante en los apartados 4.4, 4.5 y 4.6.



Figura 4.5: Residuos orgánicos listos para ensilar.
FUENTE: Propia.

Tabla 4.2: Materia prima para el ensilado de acuerdo con la clasificación del REGLAMENTO No. 68/2013.

FUENTE: REGLAMENTO (UE) No. 68/2013 DE LA COMISIÓN de 16 de enero de 2013 relativo al catálogo de materias primas para piensos.

Número	Denominación	Descripción
1.2.5	Mazorcas de maíz	Parte central de una espiga de maíz. Compuesta por la raspa, los granos y las hojas sin separar.
1.6.1	Arroz partido	Parte del grano de arroz de <i>Oryza Sativa</i> L. de una longitud inferior a tres cuartas partes de un grano entero. El arroz podrá haber sido sancochado.
1.11.4	Harinillas de trigo	Producto de la fabricación de harina a partir de granos de trigo o de espelta descascarillada previamente tamizados. Constituido principalmente por partículas de endospermo con finos fragmentos de envolturas y algunos residuos del cribado de los granos.
4.8.4	Recortes de patata, crudos	Producto obtenido de la patata durante la preparación de productos a base de patata para consumo humano, que pueden haber sido pelados.
6.2.1	Hojas de remolacha y de acelgas	Hojas de <i>Beta spp.</i>
9.1.1	Subproductos animales	Animales terrestres de sangre caliente, enteros o partes, frescos, congelados, cocidos, tratados con ácido o secos.
9.9.1	Reciclado de residuos de cocina	Todos los residuos alimenticios que contengan materias de origen animal, incluido el aceite de cocina usado, procedentes de restaurantes, servicios de comidas y cocinas, con inclusión de cocinas centrales y cocinas domésticas.
9.15.5	Cáscaras de huevo, secas	Producto obtenido de huevos de aves de corral, una vez eliminado el contenido (yema y albumen). Las cáscaras están secas.
10.4.1	Peces	Peces, enteros o sus partes: frescos, congelados, cocidos, tratados con ácido o secos.
13.1.1	Productos de panadería y de fabricación de pastas alimenticias	Productos obtenidos durante y a partir de la producción de pan, galletas, obleas o pasta. Pueden ser secos.
13.1.6	Productos y subproductos de la transformación de frutas y hortalizas frescas	Productos obtenidos al transformar frutas y hortalizas frescas (incluyendo peladuras, trozos enteros de frutas/hortalizas y sus mezclas). Pueden estar secos o congelados.

4.3 Microsilos

Acorde con el modelo de microsilo experimental utilizado en el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentaria (SERIDA) del Principado de Asturias [9].

Inmediatamente después de la recogida de la materia prima y su picado, se introdujo éste en bolsas de plástico de 700 galgas, con uno de sus extremos cerrado. A su vez, se dispone la bolsa en un tubo de cloruro de polivinilo (PVC) de 50 cm de altura y 9 cm de diámetro, ajustando la bolsa a la superficie interior del tubo. El extremo abierto de la bolsa debe quedar orientado a la parte inferior del tubo de PVC. Además se colocaron dos rejillas de diferente paso de luz a modo de filtro, justo antes de cerrar el microsilo con un tapón de goma provisto de un dispositivo para la evacuación del efluente y los gases generados (Figura 4.6).



Figura 4.6: Microsilo.

Para ayudar a crear las condiciones de anaerobiosis se colocó un peso de 2 kg encima de la bolsa de plástico, ejerciendo presión vertical sobre el ensilado.

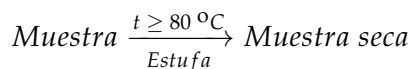
Se construyeron 3 microsilos. Además, cada microsilo debe contener aproximadamente $2,5 \pm 0,25$ kg.

4.4 Ensilabilidad de los residuos orgánicos

4.4.1. Análisis de la materia seca (%)

El método más extenso de los diferentes existentes para la determinación de la humedad es el método indirecto por volatilización. El fundamento de ésta técnica es la separación del agua de la muestra por secado en estufa, utilizando temperaturas superiores a los 80 °C.

Visto de forma esquemática:



Se pesó una muestra de ensilado fresco y, posteriormente, se trocó para aumentar la superficie de contacto. A continuación, se introdujo la muestra en un horno de secado a 70°C (con tal de evitar la volatilización de alcoholes y aceites, así como la descomposición u oxidación de algunos de los componentes) durante 16h.

Este ensayo se realizó por triplicado.

4.4.2. Análisis de los azúcares solubles

Para el análisis de los azúcares totales solubles se procedió de acuerdo con la metodología de Dubois *et al.* [37], adaptada por Moreno *et al.* [38]. Por motivos de disponibilidad, se utilizó agua con hielo en vez de nitrógeno líquido.

La metodología consiste en la maceración con agua destilada de los azúcares solubles, antes de su cuantificación mediante el método de Dubois *et al.* [37]. Éste método propone la formación de furfural (aldosas) y de 5-hidroximetilfurfural (cetosas) que, en medio ácido fuerte y deshidratante, entra en procesos de protonación/desprotonación. El derivado que se forma es reconocido por el fenol en exceso, presente en el medio, formándose compuestos de color amarillento-café. Estos compuestos se pueden leer a 490nm en un espectrofotómetro.

El rango lineal de este método es 0.01-0.6 mg de glucosa.

Materiales

- Muestra de materia prima
- Tubos de reacción tipo falcon de 15 mL
- Tubos de reacción tipo eppendorf de 2 mL
- Micropipetas con rangos de 2-20 μL , 20-200 μL y 100 a 1000 μL
- Vasos de precipitados
- Celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro
- Gradilla para tubos de 15 mL y de 2 mL
- Espátula
- Mortero
- Equipo personal de seguridad
- Papel absorbente

Equipos

- Agitador horizontal
- Centrifugadora
- Espectrofotómetro

- Balanza analítica
- Cabina de extracción
- Agitador tipo vórtex
- Potenciómetro

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado >98 %
- Fenol 80 %
- Patrón de calibración de D-glucosa 1,01 mg/mL

Metodología

Fenol 80 %: Para preparar el fenol al 80 % se pesaron 8 gramos de fenol en un frasco ámbar de 25 mL, se disolvió el fenol en agua agitando fuertemente y se completó en matraz aforado a 10 mL con agua destilada. Debe ser agitado antes de usar, ya que se forma una emulsión. Además, se debe preparar cada día de uso.

Patrón de calibración de D-glucosa: Se pesaron 0,0250 g de D-glucosa y se disolvieron con 10 mL de agua destilada, para después aforar en matraz de 25 mL. El patrón es de 1,01 mg/mL. Se debe almacenar en tubo falcon y en nevera a 4°C.

Curva de calibración: Se prepararon los patrones de la tabla 4.3, siguiendo este procedimiento: En un tubo de reacción de 2 mL se agregó el volumen respectivo de agua destilada y las diferentes cantidades de patrón con ayuda de una micropipeta. Después, en la cabina de extracción se agregaron 200 μ L de fenol 80 % (p/v) recién preparado y agitado. Por último, se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Cada patrón se agitó con vórtex y se dejó enfriar a temperatura ambiente, con cuidado ya que la reacción es altamente exotérmica. Luego, se leyó la absorbancia de cada patrón contra el blanco de reactivos (primer patrón de la tabla 4.3) a 490 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Varian modelo CARY 50 SC para elaborar la recta de calibrado, que se muestra en la figura 4.7.

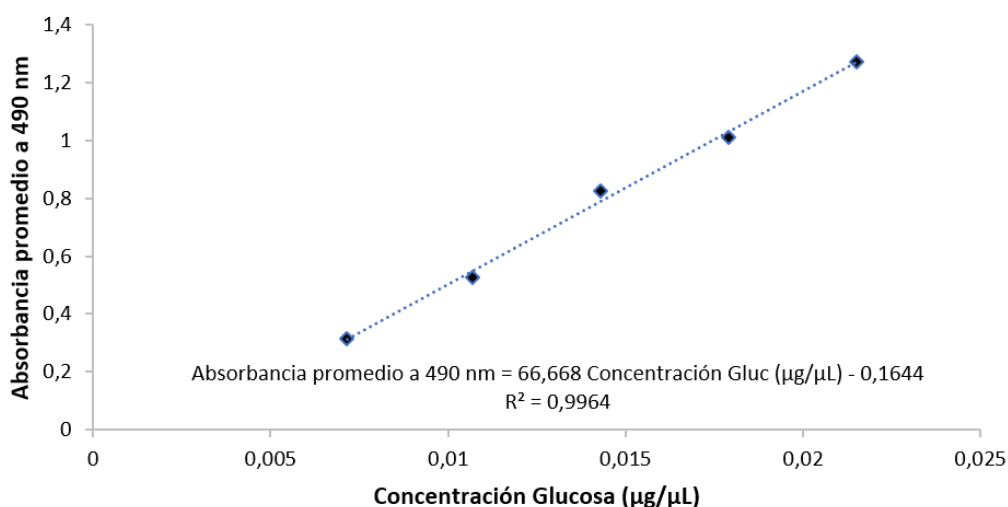


Figura 4.7: Recta de calibrado azúcares totales.

Tabla 4.3: Patrones recta de calibrado de azúcares solubles.

Agua destilada (μL)	Patrón Glucosa (μL)	Fenol 80 % (p/v) (μL)	$\text{H}_2\text{SO}_4 >98\%$ (μL)
210	0	200	1000
205	5	200	1000
200	10	200	1000
195	15	200	1000
190	20	200	1000
185	25	200	1000
180	30	200	1000

Procesamiento de la muestra: Se pesaron 10 mg de materia prima seca a 80 °C durante 16 horas y se llevaron a un tubo de reacción de 15 mL. Se agregaron 5 mL de agua destilada y se agitó a temperatura ambiente con agitador horizontal durante 60 minutos. Después se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a 12 °C y se separó el sobrenadante (extracto).

En un tubo de reacción de 2 mL se adicionaron 180 μL de agua destilada y 30 μL de extracto. Luego, dentro de la cabina de extracción se añadieron en este orden el fenol y el ácido sulfúrico, 200 μL y 1 mL, respectivamente. Se agitó la mezcla en vórtex durante 1 minuto y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por último, se leyó la absorbancia frente al blanco a 490 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Varian modelo CARY 50 SC.

Cada ensayo se realizó por triplicado y se calculó la concentración de azúcares totales en base a la absorbancia media.

A continuación se ejemplificará el cálculo para una muestra.

Se procesaron 0,1 g de muestra de materia prima con 5 mL de agua destilada. Del extracto se tomaron 30 μL para la determinación. Se realizó el ensayo por triplicado.

Tabla 4.4: Asborbancia de la muestra.

Masa (g)	A_1 490 nm	A_2 490 nm	A_3 490 nm	A Promedio 490 nm
0,1000	0,723	0,725	0,728	0,725

Teniendo en cuenta que la curva de calibración es:

$$A_{\text{Promedio}490\text{nm}} = 66,668 \cdot C_{\text{Azúcar Total}} - 0,1644 \quad (4.1)$$

Podemos determinar la concentración de azúcares totales de la muestra:

$$C_{\text{Azúcar Total}} = \frac{0,725 + 0,1644}{66,668} = 1,334 \cdot 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \quad (4.2)$$

Para encontrar la cantidad de azúcar total en reacción se multiplica la concentración obtenida por el volumen total de reacción (30+180+200+1000 = 1410 μL).

$$1,334 \cdot 10^{-2} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \cdot 1410 \mu\text{L} = 18,81 \mu\text{g de azúcar total} \quad (4.3)$$

La cantidad determinada se encuentra en 30 μL de un total de μL de extracto, por lo tanto:

$$18,81\mu\text{g} \cdot \frac{5000\mu\text{L}}{30\mu\text{L}} = 3135\mu\text{g de azúcar total} \quad (4.4)$$

Finalmente, para saber el porcentaje de azúcares solubles en la materia prima, se operará del siguiente modo:

$$\frac{3135\mu\text{g de azúcar total}}{10\text{mg de materia prima}} = \frac{313,5\text{mg de azúcar total}}{\text{g de materia prima}} = 31,35\% \text{ de azúcares totales (\%MS)} \quad (4.5)$$

4.4.3. Determinación de la capacidad tampón

Para la determinación de la capacidad tampón se procedió tal y como proponen Layne y McDonald [39]. Se maceró la muestra de materia prima fresca (100 g) con agua destilada. El macerado se tituló hasta pH <3 con HCl 0,1M con tal de liberar bicarbonatos en forma de CO_2 , para después titular hasta pH = 6 con NaOH 0,1N. La capacidad tampón se expresa como los meq necesarios para hacer variar el pH desde 4 hasta 6.

Este ensayo se realizó por triplicado.

4.4.4. Análisis de nitratos y nitritos

Para el análisis de nitratos y nitritos se utilizaron los kits de análisis para espectrofotómetro HACH (Figura 4.8). El kit de análisis para nitratos se fundamenta en el método del ácido cromotrópico, mientras que el kit de análisis para nitritos se fundamenta en el método de diazotación.

Los límites de detección de los kits son de 0,2 mg/L para nitratos y de 0,003 mg/L para los nitritos.

4.5 Calidad fermentativa del ensilado

Tal y como se ha explicado en el apartado 3.1.5, es necesario realizar un seguimiento de diversos factores para asegurar que el ensilado ha sufrido la fermentación deseada. Dichos factores son el **N soluble**, el **N amoniacal**, y los contenidos en **ácido acético**, **ácido láctico**, **ácido butírico** y **ácido propanoico**.

4.5.1. Determinación del N soluble y N amoniacal

N total

El nitrógeno total se determinó mediante el uso del kit de medición de nitrógeno total Test 'N Tube de la marca HACH, llevándose a un espectrofotómetro HACH modelo DR/2800. Dicho kit funciona en base a una digestión alcalina con persulfato, una técnica más sensible que la Kjeldahl.



Figura 4.8: Espectrofotómetro HACH.

N soluble

Para la determinación del N soluble se procedió como propone Flores [40]. Se determinó macerando con agua destilada, a 80°C, 50 g de muestra del ensilado, para después medir el nitrógeno con el kit de medición de nitrógeno total Test 'N Tube de la marca HACH, llevándose a un espectrofotómetro HACH modelo DR/2800.

N amoniacal

Para la determinación del nitrógeno amoniacal se maceró con agua destilada, a 80°C, 50 g de muestra del ensilado, para después medir el nitrógeno con el kit de medición de nitrógeno amoniacal Test 'N Tube de la marca HACH, llevándose a un espectrofotómetro HACH modelo DR/2800. Dicho kit se basa en el trabajo de Reardon, Foreman y Searcy [41]. En dicha investigación se concluyó que al tratar una disolución de nitrógeno amoniacal con una mezcla alcalina de salicilato de sodio, nitroprusiato de sodio e hipoclorito de sodio, se formaba un complejo de color verde esmeralda.

4.5.2. Determinación de ácidos grasos volátiles y ácido láctico

Para la determinación de estos compuestos se realizó mediante cromatografía de gases según la metodología descrita por Fussell y McCalley [42], adaptándolo para un cromatógrafo VARIAN CP-3800 GC acoplado a un detector FID. La temperatura del inyector

y del detector fue de 240°C, mientras que la columna del horno fue de 175°C. El gas portador fue nitrógeno, con un flujo de 40 ml/min.

El procedimiento a seguir para el análisis del ensilado fue llevar 20 gramos de ensilado fresco a una botella de cuello ancho. Se adicionaron 100 mL de agua destilada y se agitó mecánicamente durante una hora. Se filtró con un filtro Whatman No. 1. Se llevaron a un matraz aforado de 10 mL junto con 1 mL de una solución de 2,5g/L de ácido píválico (como estándar interno) y 2,5 mL de ácido oxálico 0,12M y se enrasó. Se centrifugó a 2600 g durante 5 minutos y se inyectó el sobrenadante en el cromatógrafo. Los resultados se calcularon mediante el método interno estándar, teniendo en cuenta que se habían adicionado 100 mL de agua destilada a 20 g de ensilado fresco. Posteriormente se expresarán los resultados en términos de materia seca.

El límite de detección de este método es de $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Este ensayo se realizó por triplicado.

4.6 Calidad nutritiva del ensilado

4.6.1. Toma de muestras en el silo experimental

Así como la toma de muestras en silos horizontales está muy estandarizada, la toma de muestras en silos verticales no tanto. Y mucho menos en silos experimentales. Por ello, se tomaron muestras del microsilos como si fuera un silo vertical.

Según describe Martínez [9], una toma de muestras en silos verticales debería ser efectuada mediante la toma de muestras en la zona más superficial del silo, a mitad de radio, procurando alcanzar la mayor profundidad posible con una sonda (4.9).

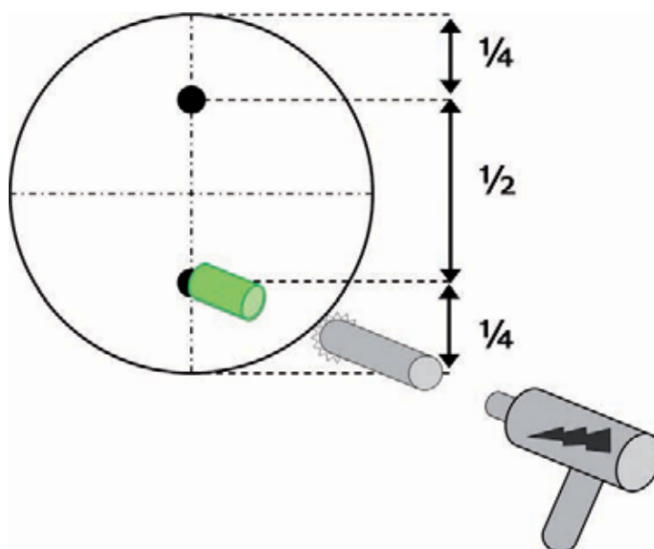


Figura 4.9: Esquema de toma de muestras en silos verticales.
FUENTE: Martínez [9]. 2014.

4.6.2. Análisis del pH

Para el análisis del pH se tomó una muestra fresca de 10 g del ensilado y se le añadieron 90 mL de agua destilada. La mezcla se dejó estabilizar durante media hora y se

procedió a la lectura del pH con ayuda de un pH-metro de la marca CRISON modelo GLP 22.

Este ensayo se realizó por triplicado.

4.6.3. Análisis de la materia seca (%)

El método más extenso de los diferentes existentes para la determinación de la humedad es el método indirecto por volatilización. El fundamento de ésta técnica es la separación del agua de la muestra por secado en estufa, utilizando temperaturas superiores a los 80 °C.

Visto de forma esquemática:

$$\text{Muestra} \xrightarrow[\text{Estufa}]{t \geq 80^{\circ}\text{C}} \text{Muestra seca}$$

Se pesó una muestra de ensilado fresco y, posteriormente, se troceó para aumentar la superficie de contacto. A continuación, se introdujo la muestra en un horno de secado a 70°C (con tal de evitar la volatilización de alcoholes y aceites, así como la descomposición u oxidación de algunos de los componentes) durante 16h.

Este ensayo se realizó por triplicado.

4.6.4. Análisis de cenizas (% MS)

Para la determinación del contenido en cenizas se operó sobre muestra secada a 80°C en estufa durante 16h.

El procedimiento seguido para determinar el contenido en cenizas consistió en incinerar una muestra del ensilado colocado en un crisol de porcelana con la ayuda de una mufla a 600°C durante 24 horas aproximadamente. Se finalizó el análisis cuando en el residuo obtenido no se observaron partículas carbonosas y las cenizas presentaron un color grisáceo uniforme.

Visto de forma esquemática:

$$\text{Muestra} \xrightarrow[\text{Mufla (500–600}^{\circ}\text{C)}]{\approx 24 \text{ horas}} \text{Cenizas}$$

Y los resultados se expresarían en tanto por ciento de la siguiente forma:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{m(\text{cenizas})}{b} \times 100$$

Donde *m* es la masa de cenizas (g) y *b* es la masa de la muestra seca (g).

Este ensayo se realizó por triplicado.

4.6.5. Análisis de FAD, FND y LAD (% MS)

Los análisis de fibra ácido detergente, fibra neutro detergente y lignina se realizaron mediante el equipo automatizado Fibertec™ 8000 sobre muestra de ensilado secada a 80°C en estufa durante 16h.

4.7 Análisis de patógenos

Tal y como aparece en el apartado 3.5, para la elaboración de este estudio se han seguido los principios del Reglamento nº 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se fijan requisitos en materia de higiene en los piensos. Aunque este reglamento es directamente aplicable en todos los Estados miembros, tiene algunos vacíos que deja en manos de cada Estado. Entre esas lagunas nos encontramos con que no se establecen criterios microbiológicos legales en los piensos [43]. La única referencia legal fue la Orden de 15 de febrero de 1988 por la que se establecen especificaciones bacteriológicas para los productos destinados a la alimentación de los animales, que actualmente está derogada. Por tanto, en base a esa referencia y a las recomendaciones de Montesinos [33], se realizaron análisis microbiológicos para:

- Salmonella
- Coliformes fecales
- E. coli

Materiales y equipamiento

- Agar
- Bolsa stomacher
- Stomacher
- Tubos de ensayo
- Agitador de tubos
- Mechero
- Pipetas estériles y pipeteador
- Agua destilada estéril

Procedimiento

Se tomaron 10 gramos del ensilado a los 4 meses y se llevaron junto con 90 mililitros de agua destilada estéril a una bolsa de stomacher. Luego, se homogeneizó la solución en el stomacher obteniendo así una dilución 1:10. No se realizaron diluciones ya que se determinó la ausencia o presencia de las bacterias. Para la siembra se tomó 1ml de las soluciones y se llevó a una placa Petri junto con 15ml del agar correspondiente para cada especie a analizar. Posteriormente las placas se incubaron en estufa durante el tiempo y la temperatura correspondiente para el desarrollo de cada especie. Posteriormente se procedió a revisar la ausencia o presencia de las bacterias.

4.8 Análisis de palatabilidad

Las pruebas de palatabilidad se realizaron en la granja *Paso Blanco* (Figura 4.10), situada en el municipio de Santa Brígida, en la provincia de Las Palmas, Gran Canaria; cuyas

coordenadas son 28°01'32"latitud norte y 15°28'17"longitud oeste. Para estudiar este factor se hicieron dos pruebas, la de preferencia y la de consumo. Los animales llevados a estudio fueron 10 gallinas ponedoras y 10 cerdos de engorde.

Para la prueba de preferencia se situaron en un habitáculo dos platos de comida, uno con un 100 % de ración de comida habitual de los animales (control) y otro con un 95 % de ración control y otro 5 % de ensilado.

Además, los animales disponían de un plato de agua. Una vez dispuesto lo anterior en el habitáculo, se introdujeron los animales uno a uno; previamente en ayunas durante 12 horas. Después se esperó a que el animal se familiarizara con los dos platos e hiciera un primer consumo de uno de ellos. Este proceso se repitió durante una semana con 5 de los cerdos y con 5 de las gallinas.



Figura 4.10: Vista aérea de la granja Paso Blanco.

Para la prueba de consumo, se mide la cantidad ingerida por el animal. Pero antes de realizarla, se realizaron 15 sesiones de consumo libre de alimentos en las que durante la hora de alimentar a los cerdos y gallinas, se les ofrecía por igual la ración control y la ración con ensilado con tal de que los dos alimentos tuvieran la misma disponibilidad y familiaridad tal y como recomienda González [44].

La ración media utilizada en la granja para los cerdos es de 2 kg de pienso/día, mientras que para las gallinas es de 150 g de pienso/día. A los animales se les sirve habitualmente en la granja un 50 % de la ración por la mañana a las 6am y el resto a las 6pm.

Para la prueba de consumo se ofreció a los animales 1,5 kg y 115 g, respectivamente, a las 6am. Es decir, a los cerdos se les dio a escoger entre 1,5 kg de alimento control y 1,5 kg de alimento con 95 % de ración control y otro 5 % de ensilado. En cambio, a las gallinas se les ofreció una ración de 115 gr de alimento control y 115 gr de alimento con 95 % de ración control y otro 5 % de ensilado.

Se pesaron las raciones ofrecidas antes y después de la ingesta para medir el consumo.

4.9 Análisis de lixiviados

Para determinar el potencial de los lixiviados como fertilizante se determinaron los nutrientes primarios necesarios para el crecimiento de la mayoría de plantas en los ferti-

lizantes, abonos o suelos [45]. Dichos elementos son el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K).

Análisis de nitrógeno (N)

El nitrógeno total se determinó mediante el uso del kit de medición de nitrógeno total Test 'N Tube de la marca HACH, llevándose a un espectrofotómetro HACH modelo DR/2800. Dicho kit funciona en base a una digestión alcalina con persulfato, una técnica más sensible que la Kjeldahl.

Análisis de fósforo (P)

La determinación del contenido en fósforo se realizó mediante el método Olsen. Este método se basa en el uso de una solución de NaHCO_3 0,5M para disminuir las concentraciones de Ca^{2+} soluble por precipitación como CaCO_3 , y Al^{3+} y Fe^{3+} por la formación de Al y oxi-hidróxidos de Fe, aumentando así la solubilidad del fósforo. Luego, el uso de la solución reductora forma un complejo capaz de determinarse por colorimetría.

Materiales

- Frasco de polietileno
- Matrices aforados
- Papel de filtro Whatman No. 42
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitados
- Espátula
- Celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para espectrofotómetro
- Papel absorbente

Equipos

- Agitador mecánico
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Cabina de extracción
- Potenciómetro

Reactivos

- Ácido sulfúrico 5N
- Reactivo A
- Reactivo B

- Agua destilada

Metodología

Solución extractora (NaHCO_3 0,5M): Se llevaron 42 g de bicarbonato de sodio a 800 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8,5 mediante NaOH 5N y se aforó a 1000 mL con agua destilada.

NaOH 5N: Se pesaron 200 g de NaOH y se aforaron en un matraz de 1000 mL.

Ácido sulfúrico 5N: Se añadieron 148 mL del ácido sulfúrico concentrado sobre aproximadamente 700 mL de agua destilada, se dejó enfriar la mezcla y se aforó a 1000 mL.

Solución patrón de dihidrogenofosfato de potasio 500 ppm: Se secaron 2,5 g de KH_2PO_4 a 105°C durante 1 hora. Luego, se pesaron 2,1970 g del KH_2PO_4 secado y se aforaron a 1000 mL con agua destilada. A partir de esta solución de 500 ppm se realizaron dos diluciones hasta obtener dos soluciones patrón de 100 y 10 ppm.

Curva de calibración: En matraces aforados de 50 mL se prepararon los siguientes patrones (Tabla 4.5):

Tabla 4.5: Patrones recta de calibrado de fósforo.

Volumen de patrón de 10 ppm (mL)	Concentración (ppm)	Volumen de patrón de 100 ppm (mL)	Concentración (ppm)
5	0,002	5	0,02
7,5	0,003	7,5	0,03
10	0,004	10	0,04
15	0,006	12,5	0,05
20	0,008	18,75	0,075
25	0,01	25	0,1

Se midieron 10 mL de los patrones y se depositaron en matraces aforados de 50 mL. Se adicionaron 10 mL de solución extractora y se ajustó el pH a 5 mediante ácido sulfúrico 5N. Se añadieron aproximadamente 15 mL de agua destilada a los matraces y 10 mL del reactivo B. Se aforó el matraz, se homogeneizó y se dejó en reposo durante 30 minutos para después leer la absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Varian modelo CARY 50 SC frente al blanco.

Reactivo A: Se pesaron 6 g gramos de heptamolibdato de amonio y se disolvieron con aproximadamente 125 mL de agua destilada. Después, se pesaron y disolvieron 0,1454 g de tartrato de antimonio y potasio en agua destilada. Las dos disoluciones se llevaron a un matraz aforado de 1000 mL, se añadieron 500 mL de ácido sulfúrico 5N y se aforó el matraz con agua destilada.

Reactivo B: Se disolvieron 0,0560 g de ácido ascórbico en 200 mL del reactivo A.

Se tomaron 2,5 mL del lixiviado y se llevaron a un frasco de polietileno de 100 mL. Se adicionaron 25 mL de la solución extractora y se agitó a 200 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Luego, se filtró la solución a través de papel de filtro Whatman No. 42. Se tomó una alícuota de 10 mL del filtrado, se llevó a un matraz aforado de 50 mL y se ajustó el pH a 5 mediante ácido sulfúrico 5N. Se adicionaron 10 mL del reactivo B, se aforó con agua destilada y se homogeneizó la mezcla. Después de 30 minutos se leyó la absorbancia a

820 nm frente al blanco (constituido por la solución extractora y las mismas adiciones realizadas a la muestra) en un espectrofotómetro UV/VIS Varian modelo CARY 50 SC.

Análisis de potasio (K)

Para el análisis de potasio se procedió según el método 3111 B. propuesto por Clesceri, Greenberg y Trussell [46]. Dicho método es el directo de llama aire-acetileno, basado en espectrometría de absorción atómica. La longitud de onda correspondía al valor de 766,5 nm. La llama era provista de una mezcla de aire-acetileno y se operó sobre un equipo VARIAN AA-240Z (Figura 4.11).



Figura 4.11: VARIAN AA-240Z

CAPÍTULO 5

Resultados

5.1 Estudio de la ensilabilidad de los residuos orgánicos

A continuación, se exponen los parámetros determinados sobre la ensilabilidad de los residuos orgánicos, en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Ensilabilidad del ensilado.

MS (%)	Azúcares solubles (%MS)	pH	Capacidad Tampón (meq NaOH/100 g MS)	Nitritos (g/kg MS)	Nitratos (g/kg MS)	CF
27,13	31,35	5,02	28	Ausencia	<10	36,09

Nos encontramos ante una materia prima con una ensilabilidad moderada. La cantidad de materia seca es del 27,13 %, superior al 25 % mínimo recomendado por Martínez [9]. Por otra parte la capacidad tampón era inferior a la recomendada, 7 unidades por debajo del límite de 35 meq NaOH/100g MS.

No se encontraron nitratos ni nitritos por encima de las recomendaciones establecidas, que en una cantidad mayor que $10\text{g NO}_3^-/\text{kg MS}$ afectan negativamente a la fermentación. En cambio, en cantidades superiores a $5\text{g NO}_3^-/\text{kg MS}$ permite obtener ensilados libres de ácido butírico, según reporta Weissbach [47].

Además de realizar el análisis comparando los parámetros uno a uno con los recomendados en bibliografía, es posible realizarlo de forma gráfica, a partir de la figura 5.1, que relaciona el contenido en MS con el contenido en azúcares solubles y la capacidad tampón para determinar la calidad fermentativa del ensilado. Sabiendo que el contenido en materia seca es del 27,13 % y la relación entre los azúcares solubles y la capacidad tampón de 1,12, situamos los puntos en la figura 5.1 y observamos que la calidad esperada del ensilado es media-alta.

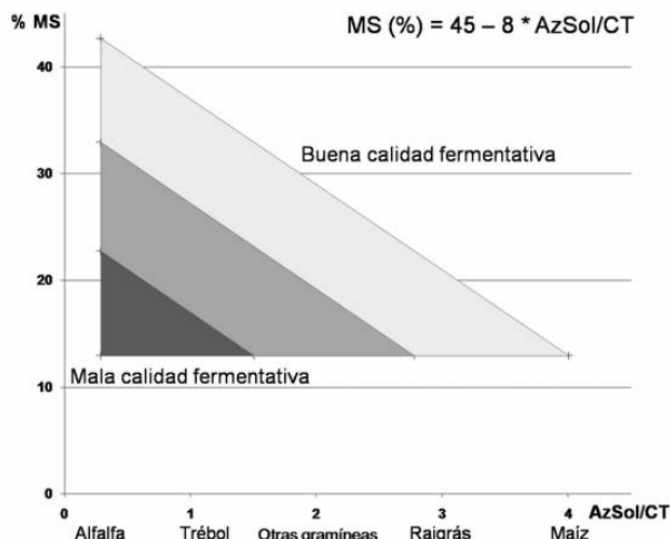


Figura 5.1: Calidad fermentativa esperable en los ensilados según la relación de los parámetros que definen la ensilabilidad.
FUENTE: Weissbach [47]. 1999.

Además de éste método, se puede considerar la ensilabilidad de la materia prima en base al índice de ensilabilidad propuesto por Martínez [9], con rangos de ensilabilidad más definidos.

Partiendo de la ecuación:

$$\text{Índice de ensilabilidad (IE)} = 152,29 - 1,97 \cdot MS + 0,85 \cdot AzSol - 3,75 \cdot CT \quad (5.1)$$

En donde:

MS = Porcentaje de materia seca

AzSol = Porcentaje de azúcares solubles sobre MS

CT = Capacidad tampón en meq NaOH/100g MS

Obtenemos un índice de ensilabilidad de 20,5. Un valor que indica al igual que con el método anterior, que la ensilabilidad de la materia prima es media-alta.

Por otra parte, el coeficiente de fermentabilidad fue de 36,09; un valor medio-alto.

En definitiva, nos encontramos con que la materia prima (residuos orgánicos de cocina) presenta una ensilabilidad media-buena.

5.2 Estudio de la calidad nutritiva del ensilado

A continuación, se exponen los parámetros de calidad nutritiva del ensilado, en la tabla 5.2.

Tabla 5.2: Calidad nutritiva del ensilado.

Tiempo	pH	MS (%)	MO (%MS)	Cenizas (%MS)	Proteína (%MS)	FND (%MS)	FAD (%MS)	LAD (%MS)	DMO (%)
45 d	3,98	39,71	85,18	14,82	7,18	15,54	12,64	3,17	72,29
2 m	3,96	40,19	85,11	14,89	7,22	16,19	12,57	3,26	72,35
4 m	3,93	40,43	84,97	15,03	7,61	17,22	13,23	3,40	72,05

El descenso y estabilidad del pH por debajo de 4 indica que la fermentación ha acidificado el medio de manera correcta, evitando así el desarrollo de Clostridios e inhibiendo las bacterias indeseadas, según afirma Martínez [9]. A pesar de que es un indicativo rápido de la estabilidad del ensilado, es mucho más fidedigno el contenido en nitrógeno amoniacal por lo que respecta a estabilidad [34].

El pH es un buen indicador de la extensión de la fermentación, y depende del contenido de MS que contiene la muestra ensilada [9]. Ésta relación se puede observar en la figura 5.2.

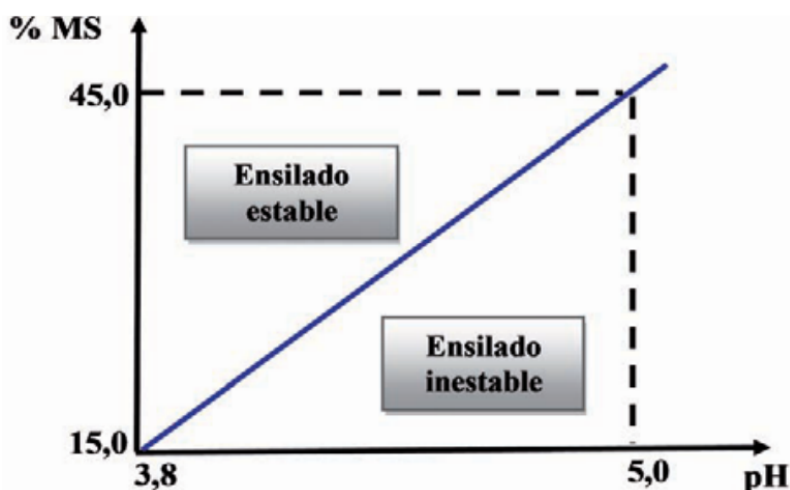


Figura 5.2: Estabilidad de un ensilado en función de la materia seca y su pH.
FUENTE: Prévion de la valeur nutritive des aliments des ruminants [34]. 1981.

En el caso de este estudio, y según este criterio, podemos hablar de un ensilado estable; ya que el contenido en materia seca resultó comprendido entre 39 y 41 %.

El contenido en proteína se mantuvo situado entorno al 7-8 %, un valor que no es demasiado alto. Debido al bajo contenido en proteína de la materia prima utilizada en el ensilado, sería interesante estudiar la inclusión de algún aditivo en el ensilado.

El contenido en FND corresponde a las paredes celulares, excepto pectina y está asociada negativamente con la ingestión de materia seca en animales [9]. Debido a que esta fibra no es digestible en su totalidad por los animales, es conveniente que no aumente de forma descontrolada. En este caso se observa un aumento del 1,68 %. La FND es un factor importante en el ensilado, puesto que está estrechamente relacionado con el consumo de alimento. Se estima que los rumiantes consumen un máximo de FND cercano al 1,2 % de su masa corporal.

Por otra parte, la FAD es la fracción de pared celular lignificada, así como LAD es el contenido en lignina. Es un factor importante en el cálculo energético del alimento, ya que cuanto mayor es el contenido en FAD, menor es la digestibilidad del alimento y la energía conteniente.

A partir de los valores de la proteína bruta y del contenido en FAD, se puede estimar la digestibilidad de la materia orgánica, según la expresión 5.2, que propone Flores [40].

$$DMO (\%) = 82,58 - 1,153 \cdot FAD - 0,03669 \cdot PB^2 + 0,06807 \cdot FAD \cdot PB \quad (5.2)$$

En donde:

DMO = Digestibilidad de la materia orgánica

FAD = Porcentaje de fibra ácido detergente expresada en términos de materia seca

PB = Porcentaje de proteína bruta expresada en términos de materia seca

Tal y como podemos observar en la tabla 5.2, la calidad nutritiva se mantiene estable en el tiempo, que es uno de los objetivos que se busca mediante el ensilaje. La DMO disminuye lentamente con el paso del tiempo como se esperaba, puesto que la composición no se mantiene exactamente igual a lo largo del ensilado.

5.3 Estudio de la calidad fermentativa del ensilado

A continuación, se exponen los parámetros estudiados para determinar la calidad fermentativa del ensilado, en la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Calidad fermentativa del ensilado.

Tiempo	N-sol ^a	N-NH ₃ ^a	Az. solubles ^b	Ac. Láctico ^b	Ac. Acético ^b	Ac. Prop. ^b	Ac. Butírico ^b
45 d	40,26	5,74	1,26	6,57	A. ^c	A. ^c	A. ^c
3 m	41,21	5,39	0,92	6,53	A. ^c	A. ^c	A. ^c
4 m	41,57	5,12	0,85	6,31	A. ^c	A. ^c	A. ^c

^a % N total

^b % MS

^c Ausencia ($< 2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

Si analizamos los parámetros obtenidos en la tabla 5.3, y los comparamos con los de la tabla 5.4 obtenida de bibliografía, podemos comentar la calidad fermentativa del ensilado producido.

Tabla 5.4: Valores de calidad fermentativa en ensilado.

FUENTE: CIATA [12]. 1998.

Calidad	N-sol ^a	N-NH ₃ ^a	Ácidos grasos volátiles ^b	Ácido acético ^b	Ácido láctico ^b	Ácido butírico ^b
Excelente	<50	<7	<4	<2	>3	Ausencia
Buena	50-60	7-10	4-7	2-4	1,5-3	Trazas
Mediocre	60-65	10-15	7-10	4-5,5	1,5-0,5	<0,5
Mala	>65	15-20	10-13	5,5-7,5	>0,5	>0,5
Muy mala	>75	>20	>13	>7,5	Ausencia	>0,5

^a % N total

^b % MS

De todos estos metabolitos, el que nos define más claramente si el ensilado está bien conservado es la ausencia total de ácido butírico [12]. Además de la ausencia del ácido butírico, se hace notar la ausencia de los ácidos acético y propanoico. Por detrás del ácido butírico, son los metabolitos secundarios más conflictivos en el proceso de ensilado [33].

Por otra parte, el nitrógeno soluble y amoniacal se mantienen por debajo de los límites de una calidad fermentativa excelente.

En último lugar, la escasez de azúcares solubles al cabo de los meses es indicadora de una buena fermentación láctica [12].

5.4 Estudio de la palatabilidad

Los resultados de las pruebas de palatabilidad son los descritos a continuación.

5.4.1. Cerdos de engorde

Durante la prueba del primer bocado se observó que al principio los cerdos mostraban una preferencia por la ración control, con el paso de los días se decantaron hacia la ración que incluía el ensilado.

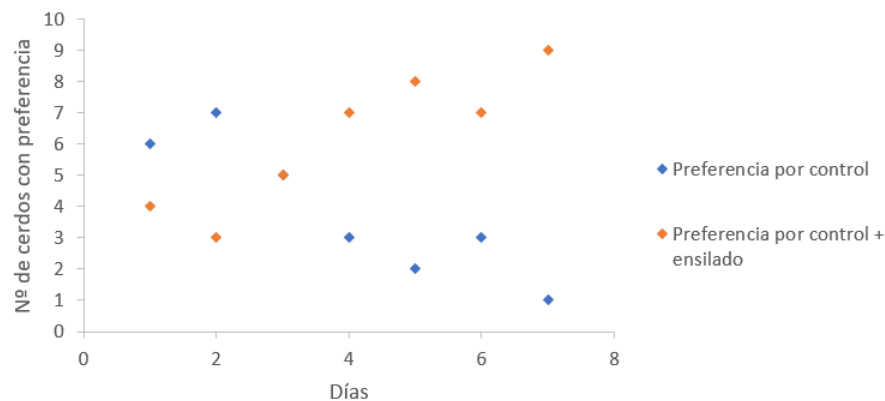


Figura 5.3: Prueba del primer bocado en cerdos de engorde

Por lo que hace a la prueba del consumo, los cerdos que optaron por la ración con ensilado consumieron una media de 23,7 % más que los que optaron por la control. Durante todo el período de pruebas el consumo de la ración con ensilado se mantuvo por encima que la control, tal y como podemos observar en la figura 5.4.

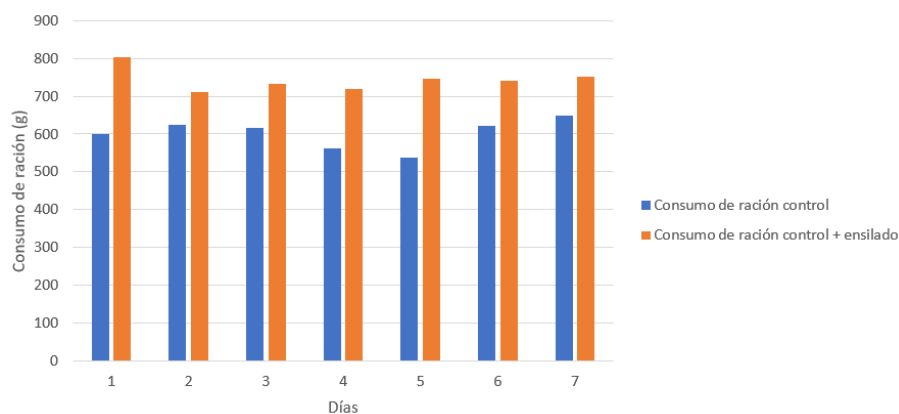


Figura 5.4: Prueba de consumo en cerdos de engorde

5.4.2. Gallinas ponedoras

La prueba del primer bocado resultó diferente a la realizada con cerdos, pues desde el primer momento las gallinas prefirieron la ración con ensilado. Esta preferencia se mantuvo durante los siete días que duraron las pruebas.

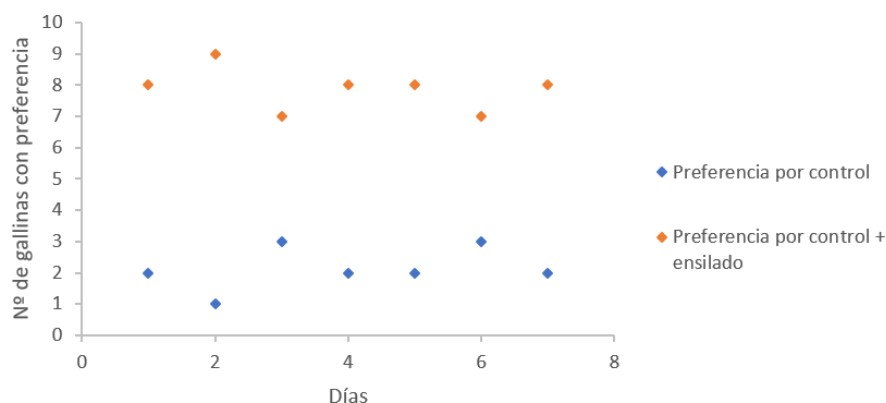


Figura 5.5: Prueba del primer bocado en gallinas ponedoras

En cuanto a la prueba de consumo y al igual que los cerdos, las gallinas que optaron por la ración con ensilado tuvieron un consumo mayor, de aproximadamente un 36 % más que las gallinas que optaron por la ración control. Esta tendencia se mantuvo durante los días que duró la prueba.

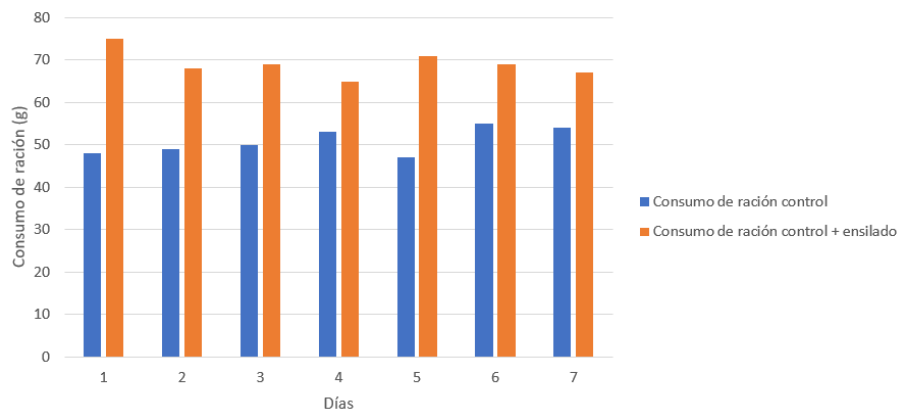


Figura 5.6: Prueba de consumo en gallinas ponedoras

5.5 Estudio de patógenos

Los resultados del estudio de microorganismos patógenos en el ensilaje se muestran a continuación.

Tabla 5.5: Presencia de patógenos en el ensilado.

Especie	Presencia o ausencia
Salmonela	Ausencia
E. coli	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia

Tal y como refleja la tabla 5.5, no se halló la presencia de Salmonela, E. coli ni Coliformes fecales. De modo que el uso de EM como inoculo no favoreció la formación de estos tres patógenos, al igual que el ensilado clásico con sólo bacterias ácido lácticas.

5.6 Estudio del potencial de los lixiviados como fertilizante

Tal y como se muestra en la tabla 5.6, el contenido en nitrógeno fue de 320 mg N/l, en fósforo de 1005 mg P/l y de 3610 mg K/l para el potasio. Los lixiviados tienen un contenido en potasio mucho mayor que el resto, y un valor para el nitrógeno muy inferior al de fósforo y potasio.

Tabla 5.6: Contenido NPK en lixiviados.

Nutriente	Contenido (mg/l)
Nitrógeno (N)	320
Fósforo (P)	1005
Potasio (K)	3610

Si expresamos esas cantidades en la nomenclatura clásica de fertilizantes NPK, donde el nitrógeno se expresa como %N, el fósforo como %P₂O₅ y el potasio como %K₂O; los contenidos se pueden leer en la tabla 5.7.

Tabla 5.7: Porcentajes NPK en lixiviados.

Nutriente	Porcentaje
Nitrógeno (%N)	0,02
Fósforo (%P ₂ O ₅)	0,19
Potasio (%K ₂ O)	0,36

Como se puede observar, el porcentaje de nitrógeno es aproximadamente cero, con lo cual los lixiviados formados se acercan más a la composición de un fertilizante PK. Sin embargo, si comparamos estos porcentajes con los rangos típicos en fertilizantes multinutrientes 5.8 o los porcentajes NPK típicos 5.9, los resultados obtenidos son bajos.

Tabla 5.8: Rango de contenidos de nutrientes típicos en fertilizantes multinutrientes.
FUENTE: Los fertilizantes y su uso [45]. 2002.

Tipo de fertilizante	Nomenclatura	(%N)	(%P ₂ O ₅)	(%K ₂ O)
Fertilizantes NPK	NPK	5-26	5-35	5-26
Fosfatos amónicos	DAP	16-18	42-48	-
Nitrofosfatos	NP	20-26	6-34	-
Fertilizantes PK	PK	-	6-30	6-30

Tabla 5.9: Grados de fertilizantes multinutrientes típicos.
FUENTE: Los fertilizantes y su uso [45]. 2002.

Fertilizante	Grados NPK
Fertilizantes NPK	22-22-11, 19-19-19, 17-17-17, 14-35-14, 14-28-14, 15-15-15, 13-13-21, 12-24-12, 12-12-17, 11-22-22, 10-26-26.
Fertilizantes NP	28-28-0, 26-14-0, 24-24-0, 23-23-0, 20-20-0, 18-46-0, 16-20-0
Fertilizantes PK	0-52-34

Las deficiencias nutricionales en los lixiviados son interesantes de solventarse con tal de obtener un fertilizante NPK o PK con el añadido de la presencia de EM. Además, de media cada uno de los microsilos experimentales de 2,5 kg de ensilaje fresco produjeron 490 mL de lixiviado al cabo de 4 meses.

CAPÍTULO 6

Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La materia prima usada en este estudio fueron los restos de cocina de diversos comedores de la *Comunidad de las Hijas de la Caridad de San Vicente de Paúl*, siguiendo una dieta equilibrada con influencias de la dieta canaria. Dicha materia prima presentó una disposición a ser ensilada media-alta según los criterios de Weissbach [47]. Por otro lado, considerando la ensilabilidad mediante el método propuesto por Martínez [9], también se concluye que los restos orgánicos de cocina utilizados en este estudio presentan una ensilabilidad media-alta.

En cuanto al análisis de la calidad nutritiva del ensilado, realizado a los 45 días, 2 meses y 4 meses; se observó que el pH había descendido por debajo de 4, indicando que la fermentación láctica había acidificado el medio de manera correcta y la estabilidad del ensilado; evitando el desarrollo de bacterias indeseadas [33]. Los contenidos en MS, MO, proteína, FND, FAD y LAD se mantuvieron estables, cumpliendo uno de los objetivos que se busca con el ensilado. La DMO, estimada matemáticamente a partir de los valores de FAD y proteína desciende lentamente con el paso de los meses, puesto que una conservación completa es imposible.

La calidad fermentativa del ensilado se valoró mediante los indicadores de N-soluble, N-amoniaco, azúcares solubles, ácido láctico, ácido acético, ácido propanoico y ácido butírico. La ausencia de ácido butírico fue el mejor indicador de que el ensilado se realizó correctamente, puesto que es el producto de la fermentación secundaria más indeseada y peligrosa para los animales [12]. Junto a la ausencia del ácido butírico, no se encontró contenido en ácido acético ni propanoico en el ensilado, indicadores de las fermentaciones secundarias indeseadas más significativas después de la butírica [33].

Los contenidos en nitrógeno soluble y amoniacal se mantuvieron por debajo de los límites de una calidad fermentativa excelente. Los azúcares solubles presentaron valores escasos al cabo del tiempo, indicando así una buena fermentación láctica, ya que los microorganismos utilizan los azúcares para producir ácido láctico.

El elevado contenido en ácido láctico es sinónimo, junto con los anteriores factores, de que la fermentación se realizó por la vía deseada.

En definitiva, el ensilado presentó una excelente calidad fermentativa.

La palatabilidad y aceptabilidad del ensilado por parte de los animales como suplemento en la dieta fue buena, ya que los animales tendieron a mostrar una preferencia por la dieta que incluía el ensilado. No obstante, las gallinas ponedoras mostraron una mayor aceptabilidad que los cerdos, ya que desde el primer día se decantaron por la die-

ta modificada. En cambio, los cerdos tardaron algunos días en decantarse por la nueva alimentación.

El empleo de EM como inóculo en el ensilado como alternativa a los inóculos tradicionales no ha inducido fermentaciones secundarias indeseadas en un ensilado común, así como tampoco ha provocado inestabilidad en el ensilado ni ha favorecido la formación de los patógenos analizados. La fermentación láctica se ha llevado a cabo sin problemas, obteniendo un contenido en ácido láctico excelente, según lo propuesto por el CIATA [12], que considera excelente un ensilado con más de un 3 % sobre MS.

En conclusión, la valorización de un suplemento alimenticio animal a partir de restos de cocina de una dieta equilibrada en la isla de Gran Canaria mediante el ensilado con EM como aditivo es posible, obteniéndose un producto estable en el tiempo bajo condiciones anaerobias y a temperatura ambiente, con una buena aceptabilidad en cerdos y gallinas. Además de la conservación, el ensilado tiene el valor añadido de contener EM, que como se ha indicado en varias investigaciones, tienen efectos beneficiosos en la salud de los animales.

Por otra parte, los lixiviados obtenidos presentaron un contenido en nitrógeno, fósforo y potasio que se muestra en la siguiente tabla (Tabla 6.1):

Tabla 6.1: Contenido NPK en lixiviados.

Nutriente	Contenido (mg/l)
Nitrógeno (N)	320
Fósforo (P)	1005
Potasio (K)	3610

El contenido en potasio es notoriamente más alto que el resto de nutrientes, con un contenido de 3610 mg K/l, mientras que el nitrógeno escasea con un valor de 320 mg N/l. Esas cantidades corresponden a los porcentajes mostrados en la tabla 6.2, cuyos valores son bajos en comparación a los típicos de fertilizantes multinutrientes.

Tabla 6.2: Porcentajes NPK en lixiviados.

Nutriente	Porcentaje
Nitrógeno (%N)	0,02
Fósforo (%P ₂ O ₅)	0,19
Potasio (%K ₂ O)	0,36

Por lo tanto, sería interesante estudiar el complementar los lixiviados con complementos nutricionales como podrían ser el nitrato sódico (NaNO_3), el sulfato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) o la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) para suplementar el nitrógeno; fosfato monocalcico y fosfato mineral para el fósforo; o el cloruro potásico (KCl) y sulfato potásico (K_2SO_4) para el potasio, hasta obtener unos valores mínimos como los que se presentan en la tabla 6.3.

Tabla 6.3: Rango de contenidos de nutrientes típicos en fertilizantes multinutrientes.
FUENTE: Los fertilizantes y su uso [45]. 2002.

Tipo de fertilizante	Nomenclatura	(%N)	(%P ₂ O ₅)	(%K ₂ O)
Fertilizantes NPK	NPK	5-26	5-35	5-26
Fosfatos amónicos	DAP	16-18	42-48	-
Nitrofosfatos	NP	20-26	6-34	-
Fertilizantes PK	PK	-	6-30	6-30

También se debe comentar que, dejando a un lado el contenido en nutrientes, una de las cualidades más llamativa de los lixiviados es el contenido en EM; ya que se ha reportado en varias investigaciones que tienen un efecto beneficioso en la microflora del suelo [24, 25, 26, 22, 23].

6.2 Recomendaciones

En base al estudio realizado se recomienda:

- Estudiar la evolución de los animales alimentados con este tipo de ensilado para comprobar los efectos benéficos de los EM en su salud.
- Estudiar el uso de una combinación de restos de cocina y otro tipo de residuo (restos de poda, subproductos de plantaciones plataneras, por ejemplo) o forraje como materia prima para el ensilaje.
- Estudiar el pretratamiento de la materia prima para obtener un mejor producto (secado, esterilización, etc).

Bibliografía

- [1] Dupuis, I., Álvarez, S., Martín, V. Evaluación de subproductos agroalimentarios para la alimentación animal en Canarias: Análisis geográfico, de viabilidad y desarrollo metodológico. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Islas Canarias, España. 2015.
- [2] Consejo Económico y Social de Canarias. La importancia de la agricultura y la ganadería en las Canarias del siglo XXI. *Informe anual 2008 sobre la situación económica, social y laboral de Canarias en 2007*. Las Palmas de Gran Canaria: CES, 2008, cap. 5.
- [3] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Guía para la implantación de la recogida separada y tratamiento de la fracción orgánica*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, España, 2013.
- [4] Carro, D., Pinto, A., Portabella, O., *Una recerca de prevenció*. UB & AMB. Cataluña, España. 2008.
- [5] Argamentería, A. et. al. *El ensilado en Asturias*. España: Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias, 1997. ISBN 8478474625.
- [6] Tatterson, I. et. al. Fish silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Abril 1974, vol. 25, no. 3, p. 369-379.
- [7] McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. The Biochemistry of Silage. *The Journal of Agricultural Science*. Reino Unido: Cambridge University Press, 1991, vol. 117, no. 3, p. 386-386.
- [8] Woolford, M. K., Pahlow, G. *Microbiology of Fermented Foods*. Vol. 3, The silage fermentation. Boston: Springer US. 1984. ISBN 9781461303091.
- [9] Martínez, A., Argamenteria, A., de la Roza, B. *El libro del ensilado*. Villaviciosa, Asturias: SERIDA, 2014. ISBN 9788461732340.
- [10] Martínez, A. et. al. Principios nutritivos y fermentativos de ensilados de hierba en función del tipo de pradera y del aditivo empleado en su elaboración. Poder contaminante de los efluentes generados. *Pastos*. Asturias: Departamento de Producción Animal. Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, 1999.
- [11] Martínez, A. et. al. Modelling a quantitative ensilability index adapted to forages from wet temperate area. *Spanish Journal of Agricultural Research*. Asturias: Departamento de Producción Animal. Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, 2013, vol. 11, no. 2, p. 455-462.
- [12] Martínez, A. et. al. Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados. *Tecnología Agroalimentaria*. 1998.

- [13] Forbes, M. Palatability: Principles, methodology and practice for farm animals. *CAB Reviews. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 2010, vol. 5, no. 52, p. 1-16.
- [14] Stein A. Van Hartevelt T. J. The functional human neuroanatomy of food pleasure cycles. *Physiology & Behavior*. 2012 vol. 106 p. 397-316 Kringelbach, M. L.
- [15] Mennella, J. A., Griffin, C. E, Beauchamp, G. K. Flavor programming during infancy. *Pediatrics*. 2004, vol. 113, p. 840-845.
- [16] Baumont, R. Palatability and feeding behaviour in ruminants. A review. *Annales de zootechnie*. Francia: INRA/EDP Sciences, 1996, vol. 45, no. 5, p.385-400.
- [17] Higa, T., Parr, J. *Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment*. Japón: International Nature Farming Research Center, 1994.
- [18] Xu, H., Parr J. F., Umemura, H. *Natural farming and microbial applications*. Nueva York: Food Products Press, 2000. ISBN 1560220821.
- [19] Kyan, T. et al. *Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms*. Japón: International Nature Farming Research Center, 1999.
- [20] EMRO USA. *About EMRO USA*. [online]. Estados Unidos. [Fecha de consulta: 22 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.emrousa.com/microorganism/about.php>.
- [21] EM Research Organization. *A few questions about EM*. En: EMRO japan (Contact) [Online]. 22 febrero 2017, 19:33 [Consulta: 24 febrero 2017; 16:15 CET]. Disponible en: <https://emrojapan.com/contact/>.
- [22] Hussain, T., et. al. Rice and wheat production in Pakistan with effective microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*. 1999, vol. 14, no. 1, p. 30-36.
- [23] Hu, C., Qi, Y. Effective microorganisms and compost favor nematodes in wheat crops. *Agronomy for Sustainable Development*. Julio 2013, vol. 33, no. 3, p. 573-579.
- [24] Xu, H. Effects of a Microbial Inoculant and Organic Fertilizers on the Growth, Photosynthesis and Yield of Sweet Corn. *Journal of Crop Production*. 2001, vol. 3, no. 1, p. 183-214.
- [25] Javid, A., Foliar application of effective microorganisms on pea as an alternative fertilizer. *Agronomy for Sustainable Development*. 2006, vol. 26, no. 4, p. 257-262.
- [26] Bajwa, R., Effects of arbuscular mycorrhizae (AM) and effective microorganisms (EM) on various plants under allelopathic stress. *Allelopathy Journal*. 2005, vol. 16, no. 2, p. 261-271.
- [27] van Vliet, P.C.J., Bloem, J., de Goede, R.G.M. Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of effective microorganisms ® (EM) to slurry manure. *Applied Soil Ecology*. 2006, vol. 32, p. 188-198.
- [28] Khaliq, A., Abbasi, M.K., Hussain, T. Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. *Bioresource Technology*. Pakistán: 2006, vol. 97, p. 967-972.
- [29] Li, W., Ni, Y. Use of Effective Microorganisms to Suppress Malodors of Poultry Manure. *Journal of Crop Production*. 2001, vol. 3, no. 1, p. 215-221.

- [30] Abd, S. K. Effect of effective microorganisms on some biochemical parameters in broiler chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2014, vol. 28, no. 1, p. 1-4.
- [31] Nuengjamnong, C., Luangtongkum, T. Effects of Effective Microorganisms on Growth Performances, Ammonia Reduction, Hematological Changes and Shedding of *Salmonella enterica* and *Campylobacter* spp. in Broilers. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. Bangkok, Tailandia: 2014, vol. 44, no. 1, p. 15.
- [32] Hitman, A. *Fermentation versus composting*. Países bajos: Feed Innovation Services BV, 2013.
- [33] ICIA. Consulta sobre ensilado [mensaje electrónico]. 29 mayo 2017. [Consulta: 29 mayo 2017]. Comunicación personal.
- [34] Andrieu, J., Demarquilly, C., Wegat-Litre, E. *Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants*. Francia: I.N.R.A publications, 1981. ISBN 9782853403757.
- [35] EMIKO. *Ficha técnica del producto EM-1 de EMIKO* [online]. Alemania. [Fecha de consulta: 20 de febrero de 2017]. Disponible en: <https://www.emiko.de/en/house-garden/soil-improvement-and-fertilisation/em1.html>.
- [36] Tarika Hoffmann. *EM questions*. En: EM Canary Islands [Online]. 24 febrero 2017, 15:13 [Consulta: 24 febrero 2017; 16:15 CET]. Disponible en: <http://em-canary-islands.com/es/contacto/>.
- [37] Dubois, M., et. al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956, vol. 28, no. 3, p. 350-356.
- [38] Moreno, L. M., Crespo, S., Pérez, W., Melgarejo, L. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. A: Melgarejo, L. M. *Experimentos en fisiología vegetal*. Bogotá, Colombia: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2010, p. 187-205. ISBN 9789587196689.
- [39] Layne, M. J., Mc Donald, P. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1966, vol. 17, no. 6, p. 264-268.
- [40] Flores, G. *Factores que afectan a la calidad del ensilaje de hierba y a la planta de maíz forrajero en Galicia y evaluación de métodos de laboratorio para la predicción de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de estos forrajes ensilados*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 2004. Tesis doctoral.
- [41] Reardon, J., Foreman, J.A., Searcy, R.L. New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clinica Chimica Acta*. Septiembre 1966, vol. 14, no. 3, p. 403-405.
- [42] Fussell, Richard J., McCalley, D.V. Determination of volatile fatty acids (C2-C5) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst*. 1987, vol. 112, no. 9, p. 1213-1216.
- [43] Comisión Nacional de Coordinación en Materia de Alimentación Animal. *Manual práctico de aplicación del reglamento (CE) N.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del consejo, de 12 de enero, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de piensos*. España: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009.
- [44] González, I. et. al. El amaranto como fuente de reforzamiento: un estudio con roedores. *Acta de Investigación Psicológica*. Agosto 2015, vol. 5, no. 2, p. 1960-1971.
- [45] Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes. *Los fertilizantes y su uso*. 4ª edición. Roma: FAO e IFA, 2002. ISBN 9253044144.

- [46] Clesceri, L., Greenberg, A., Trussell, R. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1992. ISBN 9788479780319.
- [47] Weissbach, F. Consequences of grassland intensification for ensilability and feeding value of herbage. *Contributions of Grassland and Forage Research to the development of Systems of Sustainable Land Use*. Braunschwig, Alemania: Institute of Crop and Grassland Science of the Federal Agriculture Research Centre (FAL), 1999, p. 41-53.

APÉNDICE A

Nomenclatura

<i>EM</i>	— Microorganismos Eficientes.
<i>EM – 1</i>	— Solución comercial concentrada de Microorganismos Eficientes.
<i>EM – a</i>	— Solución activada de Microorganismos Eficientes a partir de EM-1.
<i>VAM</i>	— Micorrizas vesicular-arbuscular.
<i>MS</i>	— Materia seca.
<i>AS</i>	— Azúcares solubles.
<i>CT</i>	— Capacidad tampón.
<i>IE</i>	— Índice de ensilabilidad.
<i>CF</i>	— Coeficiente de fermentabilidad.
<i>MO</i>	— Materia orgánica.
<i>DMO</i>	— Digestibilidad de la materia orgánica.
<i>FND</i>	— Fibra neutro detergente.
<i>FAD</i>	— Fibra ácido detergente.
<i>LAD</i>	— Lignina.
<i>PB</i>	— Proteína bruta.
<i>N – sol</i>	— Nitrógeno soluble.
<i>N – NH₃</i>	— Nitrógeno amoniacal.